

Lichtabhängige Wasserstoffbildung mit Grün- und Blaualgen

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung
der philosophischen Doktorwürde

vorgelegt der
PHILOSOPHISCHEN FAKULTÄT II
der
UNIVERSITÄT ZÜRICH

von
MARTIN BERCHTOLD
aus Uster

Begutachtet von
Prof. Dr. R. Bachofen

ADAG Administration & Druck AG

Zürich 1980



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Lichtabhängige Wasserstoffbildung mit Grün- und Blaualgen

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung
der philosophischen Doktorwürde

vorgelegt der
PHILOSOPHISCHEN FAKULTÄT II
der
UNIVERSITÄT ZÜRICH

von
MARTIN BERCHTOLD
aus Uster

Begutachtet von
Prof. Dr. R. Bachofen

ADAG Administration & Druck AG

Zürich 1980



INHALT

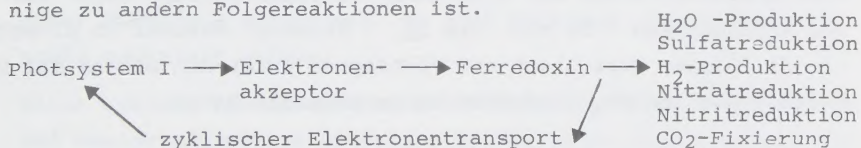
EINLEITUNG	3
PROBLEMSTELLUNG	9
I. TEIL: UNTERSUCHUNGEN MIT ALGENSTAEMMEN AUS KULTUR- SAMMLUNGEN	10
METHODEN	
1. ORGANISMEN UND KULTIVATION	10
2. VERSUCHSGEFÄSSE UND -BEDINGUNGEN	10
2.1 VERSUCHE MIT GESCHLOSSENEN GEFÄSSEN	10
2.2 VERSUCHE MIT KONTINUIERLICHER BEGASUNG	11
3. BESTIMMUNG VON BEZUGSGRÖSSEN	12
3.1 TROCKENGEWICHT	12
3.2 CHLOROPHYLLGEHALT	12
4. GASANALYSEN	13
5. AMMONIUMBESTIMMUNG	16
RESULTATE	
1. VERSUCHE MIT GRÜNALGEN	17
2. VERSUCHE MIT BLAUALGEN	20
2.1 KURZZEITEXPERIMENTE	20
2.2 STICKSTOFFAUSHUNGERUNGSEXPERIMENTE	20
2.2.1 PROZESS UNTER STANDARDBEDINGUNGEN	23
2.2.2 LICHTINTENSITÄT	31
2.2.3 TAG-NACHT RHYTHMUS	32
2.2.4 PH-WERT	33
2.2.5 TEMPERATUR	33
2.2.6 RÜHRDREHZAHL	34
2.2.7 BEGASUNGSRATE UND GASZUSAMMENSETZUNG	35
2.2.8 ZELLDICHTE	36
2.2.9 MEDIUMZUSAMMENSETZUNG	37
2.2.10 WIRKUNG VON O ₂	38
2.2.11 STICKSTOFFZUGABEN	39
2.2.11.1 AMMONIUMZUGABE	39

2.2.11.2 WIRKUNG VON MSO AUF DIE H ₂ -PRODUK- TION BEI NH ₃ -REPRIMIERTEN ZELLEN	40
2.2.11.3 AMINOSÄUREN	43
2.2.11.4 LUFT UND N ₂	45
2.2.12 NH ₃ -AUSSCHIEDUNG MIT MSO-BEHANDELTEN ZELLEN	45
2.2.13 UNTERSCHIEDE BEI VERSCHIEDENEN ORGANISMEN	46
DISKUSSION	49
ZUSAMMENFASSUNG	52
LITERATURVERZEICHNIS	54
ABKÜRZUNGEN	59
II. TEIL: UNTERSUCHUNGEN MIT AUF N ₂ -FIXIERUNG ANGEREICHERTEN BLAUALGENKULTUREN (ALS PUBLIKATION IM ARCHIV FOR MICROBIOLOGY)	60
ERGÄNZUNGEN ZUR PUBLIKATION	78
VERDANKUNGEN	82

EINLEITUNG

Eine Vielzahl verschiedener Mikroorganismen ist zur Bildung von molekularem Wasserstoff befähigt (1,2). Grün- und Blaualgen haben die Gemeinsamkeit, im Gegensatz zu allen andern Organismen, für die Wasserstoffproduktion keine organischen Substrate als Elektronendonatoren zu benötigen, sondern Wasserstoff biophotolytisch aus Wasser zu produzieren.

Schon 1942 wurde bekannt, dass gewisse einzellige Grünalgen-arten unter anaeroben Bedingungen in der Lage sind, Wasserstoff in einer lichtabhängigen Reaktion zu produzieren (3). Es wurden hauptsächlich folgende Arten auf ihre H_2 -Bildung geprüft: Ankistrodesmus, Chlamydomonas, Chlorella und Scenedesmus. Eine Uebersicht über die verschiedenen zur H_2 -Produktion befähigten Grünalgenarten gibt Kessler 1974 (2). Elektronen, die durch photosynthetische Primärreaktionen auf ein höheres Energieniveau gehoben werden, können durch die Hydrogenase auf Protonen übertragen werden. Dabei müssen andere vorhandene Elektronentransportwege unterbunden werden, da die Affinität der Hydrogenase zum photosynthetischen Elektronendonator kleiner als diejenige zu andern Folgereaktionen ist.



Alternativ Wege des Elektronenflusses

Um eine gute H_2 -Abgabe im Licht und im Dunkeln zu erreichen, ist bei Grünalgen eine bestimmte anaerobe Adaptationszeit im Dunkeln erforderlich, die von einigen Minuten bis zu mehreren Stunden dauert (4,5). Die H_2 -Produktion kann unter einer Edelgas- oder N_2 -Atmosphäre stattfinden. CO_2 als Elektronenakzeptor und O_2 , sowie auch der gebildete H_2 selbst hemmen die Reaktion. Es besteht kein direkter Zusammenhang zwischen dem H_2O -spaltenden Photosynthesystem (PSII) und der H_2 -Produktion. Möglicherweise wird das H_2 -freisetzende Photosystem (PSI) durch reduzierte organische

Substrate gespiesen, welche zuvor unter Beteiligung des O_2 -produzierenden Photosystems (PS II) gebildet wurden (6, 7). Der Anteil von PS II an der direkten Lieferung von Elektronen für die H_2 -Produktion variiert zwischen verschiedenen Organismen zwischen 0 und 50 % und ist stark von Wachstumsbedingungen (photoautotroph oder photoheterotroph) abhängig. Um die Herkunft der Elektronen feststellen zu können, wurden Versuche mit PS II Hemmstoffen (DCMU), PS II-freien Mutanten, Fütterung von organischen Substraten (Glukose) und Aushungerung im Dunkeln durchgeführt. O_2 - und CO_2 - Abgaben während der H_2 -Produktion mit adaptierten Algenzellen wurden ebenfalls als Kriterien zur Erklärung des Mechanismus der H_2 -Bildung verwendet.

H_2 -Bildungsexperimente wurden bisher meist in geschlossenen Gefäßen in kurzen Versuchszeiten gemacht. Dies könnte ein Grund sein, weshalb die Wasserstoffproduktion schon kurz nach Beginn wieder zum Erliegen kommt (spätestens nach einem Tag). Eine Umgebungsatmosphäre von nur 0,2 % O_2 hat einen hemmenden Einfluss auf die H_2 -Produktion (2). Mittlere und hohe Lichtintensitäten wirken, möglicherweise wegen der erhöhten O_2 -Freisetzung, ebenfalls hemmend auf die Hydrogenasereaktion (6).

Die gemessenen Raten der H_2 -Bildung betragen während einer kurzen Anfangsphase (20 min. bis ca. 3 Stunden) maximal 15 $\mu\text{l/mgTG} \cdot \text{h}$ (4). Dieser Wert liegt ein Vielfaches unter den anhand der O_2 -Freisetzung und CO_2 -Produktion zu erwartenden Raten.

Blualgen verfügen über mindestens zwei verschiedene H_2 -produzierende Enzymsysteme, wobei das eine ähnlich demjenigen der Grünalgen ist. In der Physiologie unterscheiden sich Blau- und Grünalgenhydrogenase jedoch. Viele Blualgen besitzen morphologisch und physiologisch speziell differenzierte Zellen, die Heterocysten, in welchen die Hydrogenase, verglichen mit Grünalgen, weniger empfindlich gegenüber Inaktivierung durch O_2 (50 % Hemmung durch 5-6 % O_2) ist (8). Dies könnte biochemisch durch O_2 -verbrauchende Reaktionen oder mechanisch durch bestimmte Zellwandstrukturen erklärt werden. Zudem findet in Heterocysten im Gegensatz zu den vegetativen Zellen auch keine

photosynthetische O_2 -Produktion statt (kein PS II). Wie bei Grünalgen ist diese H_2 -Abgabe reversibel und nicht abhängig von in der Zelle gebildetem ATP (9). Es wird vermutet, dass dieses Enzym die physiologische Aufgabe hat, (a) Wasserstoff, welcher in geringem Mass bei der Stickstofffixierung immer anfällt, zu rezyklisieren, um Energieverluste auszugleichen; (b) dazu beiträgt, die Zelle (Heterocyste) anaerob zu halten, indem durch die Knallgasreaktion der Sauerstoff entfernt würde; oder (c) daran beteiligt ist, dass genügend Reduktionsäquivalente für die Nitrogenasereaktion zur Verfügung stehen (10).

Bei Anabaena cylindrica existiert die Hydrogenase in 2 Formen; eine, welche die H_2 -Bildung reversibel katalysiert (11,12) und eine ausschliesslich H_2 -aufnehmende Enzymaktivität (13). In diesem Organismus wird wegen der überwiegenden H_2 -Aufnahmeaktivität keine, oder eine nur sehr geringe in vivo Produktion von H_2 gefunden (14, 15, 15, 17).

Eine grosse Anzahl von Blaualgenarten verfügt über die Eigenschaft, molekularen Stickstoff fixieren zu können. Die Nitrogenase katalysiert diese Reaktion. Das N_2 -reduzierende Enzym ist relativ unspezifisch; neben N_2 werden eine ganze Reihe anderer Substrate akzeptiert, so auch Protonen, die zu Wasserstoff reduziert werden.

Unter aeroben Bedingungen sind nur heterocystenhaltige, fädige und wenige einzellige Blaualgen in der Lage, Stickstoff zu fixieren (18). Unter anaeroben oder mikroaerophilen Bedingungen können auch heterocystenlose Blaualgen eine Nitrogenaseaktivität entwickeln (19, 20, 21, 22).

Die durch das Nitrogenasesystem katalysierte H_2 -Freisetzung ist irreversibel und abhängig von Energie aus dem Stoffwechsel (ATP). Sie wird durch molekularen Stickstoff gehemmt. Wenn sie in den Heterocysten stattfindet, ist sie relativ sauerstoffunempfindlich. Die H_2 -Abgabe ist abhängig von in den Zellen gebildeten organischen Substraten, welche bei heterocystenhaltigen Blaualgen von den vegetativen Zellen in die Heterocysten transportiert werden müssen und dort als Energiequelle dienen. Deshalb

muss eine Blaualgenkultur, um H_2 über die Nitrogenase zu produzieren, mit CO_2 versorgt werden.

Um die verschiedenen für die H_2 -Bildung verantwortlichen Enzymaktivitäten voneinander unterscheiden zu können, wurden folgende Methoden vorgeschlagen. Bothe (16) verwendet eine Gasphase mit CO und C_2H_4 (optimale Konzentrationen 0,6 bzw. 30 %). CO hemmt alle durch die N_2 -ase katalysierten Reduktionen ausser der H_2 -produktion. C_2H_4 blockiert Hydrogenasen, welche durch die N_2 -ase gebildeten Wasserstoff wieder aufnehmen könnten. Durch diese Methode erhält man eine nur durch die ATP-abhängige N_2 -ase getriebene H_2 -Bildung (16,23). Mit Entkopplern (zB. CCCP) kann gezeigt werden, welcher Anteil der H_2 -Produktion von der Nitrogenasereaktion stammt. Wenn man unter einer N_2 -Atmosphäre oder mit gebundenem Stickstoff im Medium und zusätzlich einem Entkoppler arbeitet, kann eine durch die Nitrogenase getriebene H_2 -Produktion ausgeschlossen werden. Ebenso lässt sich bei der Verwendung von Reduktionsmitteln wie Dithionit und Methylviologen die in vivo Hydrogenaseaktivität unabhängig von Nitrogenasereaktionen verfolgen (24).

Die zum Teil bei Blaualgen gefundene geringe H_2 -Produktion (16, 25) ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die in vivo Aktivität für H_2 -Aufnahme gross ist. Durch geeignete Manipulation der Bedingungen, zB. durch Zugabe von CO und Acetylen, kann bei Anabaena cylindrica eine bis zu 30-fach höhere H_2 -Produktion beobachtet werden (16,23).

Zwischen der gleichzeitigen H_2 und O_2 -Produktion besteht kein direkter Zusammenhang. Meist wird wesentlich mehr O_2 als H_2 produziert. Benemann (26) konnte bei Anabaena cylindrica B-629 während 3 Stunden eine lichtabhängige gleichbleibende H_2 -Bildungsrate nachweisen und zwar in einer Argon Atmosphäre. Eine Adaptationszeit ist im Gegensatz zu Grünalgen nicht notwendig. Die H_2 -Produktionsrate betrug $10.8 \mu l/mg \text{ TG.h}$, was nahe beim Wert der Acetylen-Reduktion liegt. Die Hemmung der Reaktion durch O_2 (18 %) und DCMU ($10^{-5} M$) betrug weniger als 30 % des Kontrollwertes. Spätere Untersuchungen mit Zugabe von Hydrogenasehemmstoffen ergaben jedoch viel geringere (1000 - 10 000 x) Produk-

tionsraten (16, 25, 27). Möglicherweise basieren solche Unterschiede auf der Verwendung verschiedener Algenstämme, die verschiedene Hydrogenaseaktivitäten aufweisen.

Durch physiologische Massnahmen ist es möglich, die Wasserstoffproduktion zu steigern. Indem man Zellen von Anabaena cylindrica an Stickstoff aushungert, erreicht man nach ein bis drei Tagen eine maximale H_2 -Produktionsrate, die um ein Vielfaches höher sein kann als ohne Aushungerung. In einer 1977 erschienenen Arbeit wurde eine über 18 Tage andauernde Wasserstoffproduktion mit Anabaena cylindrica beschrieben (28). Während des Aushungerungsprozesses sank das Verhältnis O_2/H_2 bis auf 1/2, was der Stöchiometrie der Wasserspaltung entspricht. Die gleichen Autoren erreichten mit einer Belichtungsstärke von 20 W/m^2 während einer Woche eine H_2 -Produktion mit einer Lichtausbeute von 0,4%. Bei schwächerer Belichtung (6 W/m^2) erzielten Jeffries et al (29) mit derselben Blaualgenart eine Effizienz von 0,35% über 28 Tage.

Neben der photolytischen Wasserspaltung mit Grün- oder Blaualgen bieten sich ebenfalls zellfreie Systeme an, wobei die einzelnen Komponenten aus verschiedenen Organismen stammen können. Dazu ist notwendig: Chloroplasten oder Chloroplastenfragmente, eine Hydrogenase und Ferredoxin. Nach dem Beweis, dass diese Reaktion möglich ist, (30, 31) wurde versucht, grössere Raten über eine längere Zeit zu erhalten (32, 33, 34). Die grössten Probleme dabei waren, dass zT. Komponenten aus verschiedenen Zellen nicht miteinander reagierten und vor allem die Stabilität des wasserspaltenden Systemes ungenügend war. Es wurde auch gefunden, dass durch unbeabsichtigte Autooxidationsprozesse Elektronen verloren gehen können. Packer (35) konnte durch stabilisierende Faktoren (Glukose und Glukose-Oxydase) erreichen, dass 70 % der transportierten Elektronen (Ferricyanid Hill Reaktion) auf H^+ übertragen werden. Während 6-8 h wurde mit einer Rate von $10\text{-}25 \text{ } \mu\text{M/mg Chl.h}$ Wasserstoff freigesetzt. Aehnliche Werte erreichten Rao et al schon 1976 (34) mit einem System bestehend aus Spinat-Chloroplasten, Spirulina Ferredoxin und Glukose mit Glukose-Oxydase. Die bisher höchste publizierte Rate beträgt $125 \text{ } \mu\text{M } H_2/\text{mg Chl.h}$. Dies konnte

durch Verhinderung von Nebenreaktionen von reduziertem Methylviologen erreicht werden (33), indem intakte Thylakoidvesikel verwendet wurden. Dabei wurde das Photosystem II jedoch nicht benützt. Es war völlige Anaerobiose und eine Kopplung der PS I-Aktivität mit Methylviologen zu Clostridium-Hydrogenase nötig.

Vielleicht ist ein stabiles, zellfreies System besser zu erreichen, wenn einzelne biologische Komponenten durch vollsynthetische ersetzt werden. So erreichten z.B. Adams, Rao und Hall (pers. Mitteilung) mit Platinoxid (PtO_2) als Hydrogenaseersatz eine ähnlich hohe H_2 -Produktion wie mit dem Enzym, wenn Methylviologen als Elektronenüberträger verwendet wurde. Methylviologen konnte auch ohne Chloroplasten beim Vorhandensein von Proflavin und einem geeigneten Elektronendonator (z.B. EDTA) im Licht reduziert werden.

PROBLEMSTELLUNG

Das Ziel der Arbeit war es, die Bedingungen abzuklären, unter welchen die Biophotolyse von Wasser mit optimaler Effizienz verläuft. In erster Linie mussten die mikrobiologisch-physiologischen Grundlagen geschaffen werden, welche es später auch erlauben sollten, Möglichkeiten für einen grosstechnischen Einsatz abzuschätzen.

Wie in der Einleitung diskutiert wird, kann dieses Ziel entweder durch die Verwendung von intakten Organismen (Grün- oder Blaualgen) oder durch die Konstruktion eines halbsynthetischen Systemes erreicht werden. Da ein zellfreies System erst langfristig effizient eingesetzt werden kann (Aufbereitung der Komponenten, relativ kleine Stabilität), wurde das in vivo System gewählt.

Aufgrund der in der Literatur zum Teil widersprüchlichen Angaben über H_2 -Produktionsraten bei den relativ wenigen bisher untersuchten Blaualgenstämmen wurden verschiedene Algen aus Algensammlungen auf ihre Eignung als H_2 -Produzenten geprüft.

Durch gezielte Manipulation der Versuchsbedingungen, z.B. um das Absinken der H_2 -Produktionsaktivität zu verhindern, wurde auch versucht, die Effizienz und Stabilität der Wasserstoffbildung zu erhöhen.

Da die Aussicht zum Auffinden von guten H_2 -Produzenten in der Natur als günstig erachtet wurde, wurde zusätzlich eine Sammlung mit Proben aus der Umgebung des Institutes angelegt, mit Hilfe selektiver Medien Blaualgen angereichert und H_2 -Bestimmungen durchgeführt. Lambert und Smith (36) fanden einige marine heterocystenhaltige Blaualgen, die zu einer lichtabhängigen H_2 -Bildung befähigt sind. Ebenso isolierten Mitsui und Kumazawa (37) tropische marine Blaualgenstämmen mit hohen H_2 -Bildungsraten.

METHODEN

1. Organismen und Kultivation

Von den verwendeten Algen stammen aus der Algensammlung des Pflanzenphysiologischen Instituts der Universität Göttingen: Anabaena cylindrica 1403-2, Scenedesmus obliquus 276-3a, Ankistrodesmus braunii 202-7a, Chlorella fusca 211-8b; Anabaena cylindrica B-629 ist ein Geschenk von Dr. Benemann, University of California, Berkeley USA; Mastigocladus laminosus Th von Dr. A. Binder, Universität Zürich. Anabaena inaequalis B-381, Anabaena flos aquae 1444, Gloeocapsa sp LB 795, Cylindrospermum sp 942, Nostoc commune 486 und Plectonema boryanum 594 kommen aus der Algensammlung von Dr. Starr, Universität Texas, Austin USA.

Zur Anzucht der Algen wurden Mineralsalzmedien, bei Grünalgen mit gebundenem N nach Kessler und Czygan (38), bei Blaualgen ohne N nach Bothe und Loos (39) mit erhöhter Fe-(4x) und Mo-(20x)-Konzentration und 2 x kleineren CaCl_2 und MnCl_2 Menge. Allen Blaualgenmedien wurden Co (0,03 mg/l) und Vit. B_{12} (0,5 $\mu\text{g/l}$) beigegeben. Durch separates Autoklavieren von Eisen- und Phosphatlösungen erreicht man, dass das Medium klar bleibt. Nach dem Autoklavieren hat das Medium einen pH-Wert von $7,8 \pm 0,1$. Die Algen wurden bis zur gewünschten Suspensionsdichte auf einer Schüttelmaschine (150 rpm) bei 28°C und einer Lichtintensität von ca. 10 W/m^2 (Fluoreszenzlampen unter steriler Belüftung (Luft + 1% CO_2)) herangezogen. Alle Algenstammkulturen wurden auf Schrägagars (1%) mit derselben Zusammensetzung wie bei Flüssigmedien in einem Lichtschrank bei ca. 30°C aufbewahrt und jeden Monat frisch überimpft.

2. Versuchsgefäße und Versuchsbedingungen

2.1. Versuche mit geschlossenen Gefäßen

Ein Teil der Experimente wurde in einem von unten belichteten (normalerweise 20 W/m^2), mit einem speziellen Halter ausgerüsteten Warburgschüttelapparat bei 28°C durchgeführt. Als In-

kubationsgefäße wurden 9 oder 17 ml Fläschchen, mit einer Butylgummimembran verschliessbar und 1-2 ml Zellsuspension enthaltend, verwendet. Die Fläschchen wurden jeweils je 10 min. evakuiert, dann mit dem für den Versuch verwendeten Gasgemisch gespült. H_2 -Konzentrationen wurden unter verschiedenen Bedingungen (Gasphase, Belichtung, Hemmstoffe, Zeit, Vorbehandlung der Zellen) gemessen, indem Gasproben mit einer Spritze entnommen und gaschromatographisch analysiert wurden. Diese Methode wurde auch bei Versuchen mit Anreicherungskulturen verwendet.

2.2. Versuche mit kontinuierlicher Begasung

Für Langzeitversuche wurden Gaswaschflaschen (300 ml) oder 5 l Flaschen (Höhe 31 cm, Durchmesser 18 cm) verwendet. Die Kulturen wurden mit einem Magnetrührer durchmischt und ständig mit einem Trägergas (N_2 bei Grünalgen, zur Adaptation zusätzlich mit H_2 ; $Ar + CO_2$ bei Blaualgen) begast und die H_2 -Konzentration im Trägergas nach dem Durchströmen durch die Kultur bestimmt. Zur Kontrolle der Versuchstemperatur wurde ein thermostatisierbares Wasserbad verwendet. Die Belichtung erfolgte mit einer oder 2 160 W Quecksilber-Spotlampen (mit relativ hohem Anteil an für die Photosynthese nicht verwertbarem Licht über 700 nm). Die Messung der Lichtintensität erfolgte mit einem YSI-Kettering Radiometer Modell 65. Die Lichtintensität wurde durch Verwendung von Neutralfiltern variiert. Die Lichtverteilung in der Kulturflasche war trotz Verspiegelung nicht homogen, deshalb wurde das Lichtangebot für jede einzelne Zelle abhängig von der Rührdrehzahl. Für die Berechnungen der Photosyntheseausbeute wurden gemittelte Werte der Lichtintensität verwendet. Um möglichst homogene Lichtverhältnisse im Kulturgefäß zu erzielen, wurde normalerweise mit sehr geringen Zelldichten gearbeitet. Es ist dahernaheliegend, dass ein Teil des eingestrahlten Lichtes ungenutzt durch die Kultur hindurchging. Photosyntheseausbeuten wurden berechnet, indem die freie Energie des gebildeten Wasserstoffes (215,7 kJ/mol) auf die total auf die Gefäßfläche eingestrahlte Lichtenergie ohne Berücksichtigung des nichtabsorbierten Lichtes bezogen wurde.

Folgende Standardbedingungen für N -Aushungerungsversuche mit

Blaualgen wurden verwendet: Belichtung, 40 W/m^2 ; Temperatur, 29°C ; Rührung, 300 Upm mit Magnetrührer; B-Medium pH 7,8; Begasung, Ar + CO_2 1%, 25 bis 35 ml/min.; Trockengewicht zu Beginn des Versuches: 0,02 bis 0,1 g/l. Für die Abklärung der Effekte von verschiedenen pH und Rührdrehzahlen wurde Anabaena cylindrica B-381, für alle andern Optimierungsversuche Anabaena cylindrica 1403-2 verwendet. Jeweils während ca. 20 - 30 h vor dem Beginn der N_2 -Aushungerung wurden die Versuchsgefäße angeimpft und unter Standardbedingungen unter Belüftung (ca. 500 ml/min) an die Versuchsbedingungen angepasst.

3. Bestimmung von Bezugsgrößen

3.1. Trockengewicht

Das Wachstum wurde anhand von Trockengewichtsveränderungen (auf Glasfaserfiltern bei 85°C , 14 - 18 h) oder indirekt anhand der optischen Dichte bei 740 nm gemessen. Diese optische Methode ist nur bei Algen möglich, welche nicht sofort aggregieren, wenn sie nicht mehr geschüttelt werden ; zudem muss für jeden Algenstamm ein anderer Umrechnungsfaktor zu Erhaltung des Trockengewichtes verwendet werden. Für Anabaena cylindrica konnte ein aus verschiedenen Versuchen ermittelter Mittelwert von $0,21 \times \text{OD } 740 = \text{gTg/l}$ erhalten werden. Für Trübungsmessungen wurden die Proben jeweils auf $\text{OD } 740 = 0,1$ bis $0,2$ verdünnt.

3.2. Chlorophyllgehalt

Chlorophyllkonzentrationen wurden anfänglich nach Extraktion mit 80% Aceton und zusätzlicher Ultraschallbehandlung (2 x 1 min.) spektrophotometrisch bei 663 nm bestimmt. Da bei der Chlorophyll a Bestimmung mit Acetonextraktion keine vollständige Ausbeute erhalten werden konnte, wurde nach dem Ausprobieren verschiedener Extraktionsverfahren folgende Methode verwendet: 5 ml Zellsuspension werden durch ein Glasfilter abfiltriert, dieses mit H_2O dest. gewaschen, mit 100 % Methanol 12 - 18 h im Dunkeln bei 4°C extrahiert und der Ueberstand (10 min bei 3000g) bei 665 bzw. 750 nm gemessen. $(\text{OD } 665 - \text{OD } 750) \times 13,4$ ergibt mg Chl/l nach MacKinney(4)

4. Gasanalysen

Zur Messung von Gaszusammensetzungen wurde ein Gaschromatograph Gow Mac 69-550 mit einem Wärmeleitfähigkeitsdetektor verwendet. Das Funktionsprinzip besteht darin, dass die Mobilität von Gasen und dadurch ihre Wärmeleitfähigkeit vom Molekulargewicht abhängig ist. Gemessen wird die Differenz des Widerstandes zwischen 2 Drähten, die durch das Vorbeifliessen eines Gases mit anderer Leitfähigkeit als diejenige des Trägergases in der Referenzzelle entsteht.

Zur Ermittlung der optimalen Bedingungen für grösstmögliche Empfindlichkeit wurde folgende Formel verwendet:

$$S = K \cdot I^2 \cdot R \cdot \frac{\Delta\lambda}{\lambda_{c.g.}} \cdot (T_f - T_b)$$

S = Empfindlichkeit, K = Zellenkonstante (von der Anordnung der Filamente und des Detektorblockes abhängig), I = Stromstärke in den Filamenten, R = Filamentwiderstand, $\lambda_{c.g.}$ = Wärmeleitfähigkeit des Carriergases, $\Delta\lambda$ = Differenz der Wärmeleitfähigkeit zwischen Carriergas und zu bestimmendem Gas, T_f = Filamenttemperatur und T_b = Detektorblocktemperatur.

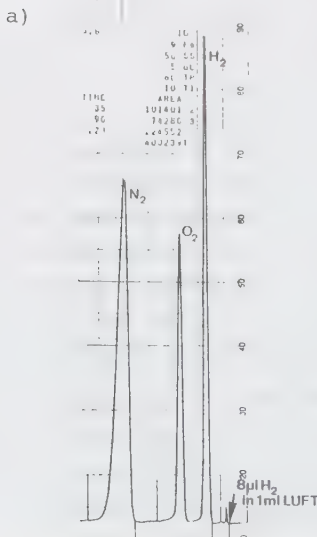
Aus dieser Formel ist ersichtlich, dass durch die Erhöhung von $\Delta\lambda$, $T_f - T_b$ und vor allem von I eine Verbesserung der Empfindlichkeit zu erwarten ist. Durch die Erhöhung der Stromstärke wird gleichzeitig auch eine Erhöhung der Filamenttemperatur bewirkt. Bei der Verwendung von Ar als Trägergas ergab die Erhöhung der Stromstärke von 120 auf 130 mA eine um 50 % verbesserte Empfindlichkeit. Die Stromstärke kann jedoch je nach Trägergas und Flussgeschwindigkeit nur bis zu einem bestimmten Wert erhöht werden, da die Filamente bei zu hoher Belastung durchbrennen können (Für He 250 mA und für Ar 125 mA während längerer Zeit). Normalerweise wurde mit einer Stromstärke von 115 bis 120 mA mit Ar als Trägergas gearbeitet.

Die Wahl eines geeigneten Trägergases ist entscheidend für die Detektorempfindlichkeit. Um eine grosse Sensitivität für H_2

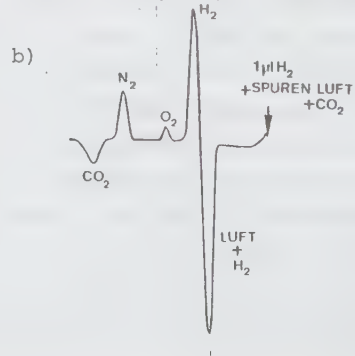
($\lambda = 39,6 \text{ cal/cm.sec/}^{\circ}\text{C}$ bei 0°C) zu erhalten, eignen sich N_2 ($\lambda = 5,7 \text{ cal/cm.sec/}^{\circ}\text{C}$) und Ar ($\lambda = 3,9 \text{ cal/cm.sec/}^{\circ}\text{C}$). Benutzt man Ar als Trärgas, so erhält man eine bis zu 1000 fach empfindlichere Bestimmung von H_2 als mit Helium ($\lambda = 33,6 \text{ cal/cm.sec/}^{\circ}\text{C}$). Will man jedoch O_2 -Konzentrationen ($\lambda = 5,7 \text{ cal/cm.sec/}^{\circ}\text{C}$) bestimmen, so verwendet man besser ein Trärgas mit hoher Leitfähigkeitskonstante (z.B. Ar). Obwohl mit N_2 als Trärgas H_2 ca. 80 mal empfindlicher als mit He gemessen werden kann, schied N_2 für Versuche mit Blaualgen aus, da dabei Edelgase (He oder Ar) zur Begasung der Kulturen verwendet werden. He eluiert jedoch bei der Verwendung von N_2 als Trärgas mit H_2 und Ar mit O_2 zusammen. Nach Tests mit verschiedenen Trärgasen (He, N_2 und Ar) wurde ausschliesslich Ar verwendet.

Zur Trennung von Gasgemischen dienten Molekularsiebsäulen mit verschiedenen Dimensionen (91,5 x 0,4 cm innen ϕ , 183 x 0,2 cm innen ϕ). Die kurze Säule wurde für H_2 -Bestimmungen eingesetzt. Für den Referenzgasstrom wurde entweder die längere Molekularsiebsäule oder eine Poropak T Säule verwendet. Mit dem Molekularsiebmaterial (NaAl-Silikat, 5 Å, 60/80 mesh) werden H_2 , O_2 , N_2 , CH_4 und CO getrennt (Fig. 1a), CO_2 und H_2O bleiben jedoch in der Säule

Fig 1 Gasanalysen mittels Gaschromatographie



- a) Trärgas Ar, 10 ml/min., 115 mA
Molekularsieb 5 Å, Papiervorschub 1 cm/min, Abschwächung 32
- b) Trärgas He, 20 ml/min, 250 mA
Zimmertemperatur, zuerst Poropak T, dann Mol. Sieb 5 Å, Papiervorschub 1 cm/min, Abschwächung 8



zurück. Bei Dauergebrauch (alle 5 bis 10 min eine Injektion) mussten die Molekularsiebsäulen alle 2-3 Monate reaktiviert werden (5 h bei 350°C im Ar Strom) um anhaftendes H_2O und CO_2 zu entfernen. Zur Messung von CO_2 wurde zusätzlich eine Poropak T Säule (80/100 mesh) verwendet. Es wurde auch ein Versuch unternommen, mit einer Injektion gleichzeitig H_2 , O_2 , N_2 und CO_2 zu trennen. Dies wurde erreicht, indem das Gasgemisch zuerst durch eine Poropaksäule, anschliessend durch den Detektor, dann durch eine Molekularsiebsäule und erneut durch den Detektor (Referenzseite) geführt wurde. Fig 1b zeigt, dass zuerst das ungetrennte Gasgemisch (H_2, O_2 und N_2) im Detektor erscheint. Während der Zeit bis das eluierte CO_2 erscheint, kommen H_2, O_2 und N_2 getrennt durch die Molekularsiebsäule durch den Referenzteil des Detektors (deshalb die entgegengesetzte Spannungspolarität).

Die Retentionszeiten der einzelnen Komponenten eines Gasgemisches sind stark vom Trägergasfluss abhängig. Beim kontinuierlichen Einsatz des Gaschromatographen wurde mit relativ kleinem Durchfluss (5 - 15 ml/min. Ar) gearbeitet. Die Retentionszeit beträgt dabei für N_2 ca. 6 min. Bei höherer Flussgeschwindigkeit (60 bis 80 ml/min.) können H_2 , O_2 und N_2 immer noch sauber getrennt werden, wobei alle Komponenten nach 2 bis 3 min. eluieren.

Da durch die mögliche Variation der Ofen- und Detektortemperatur kein bedeutender positiver Effekt erwartet werden konnte, und zudem die Temperaturkonstanthaltung mit dem zur Verfügung stehenden Gerät grosse Schwierigkeiten bot, wurde bei Zimmertemperatur gearbeitet. Bei Messungen im höchsten Empfindlichkeitsbereich hatten Temperaturschwankungen im Raum einen negativen Einfluss auf den geraden Verlauf der Grundlinie.

Die Gasproben wurden mit 0,7 x 80 mm Kanülen durch ein Septum injiziert. Septen mussten relativ häufig ersetzt werden, da durch das Durchstechen mit der Nadel feine Gummipartikel, welche den Gasfluss blockieren können, abgelöst werden. Bei Versuchen mit kontinuierlichem Gasfluss wurde ein automatisches GC-Einspritzventil (Carlo Erba AG) verwendet, womit alle 3-5 min. eine Probe (3 ml) gemessen werden konnte.

Mit dieser Methode kann auch gebildeter Sauerstoff zuverlässig bestimmt werden, da keine Kontamination mit Luftsauerstoff stattfinden kann.

Zur quantitativen Auswertung von Gasanalysen wurden Eichkurven erstellt. Verschiedene H_2 -Konzentrationen wurden durch Verdünnen mit Luft in 1 ml Spritzen hergestellt. Mit Hilfe eines Integrators (Minigrator, Spectra Physics), der für Langzeitversuche automatisch angesteuert werden konnte, wurde eine Eichkurve über einen Konzentrationsbereich von 0,001 bis 10 μ l anhand der Peakflächen aufgenommen. Sie zeigt einen mehr oder weniger linearen Verlauf. Wird jedoch die Höhe der Peaks als Eichwert verwendet, so zeigt die Kurve deutliche Abweichungen, indem bei grösser werdenden H_2 -Konzentrationen die Peakhöhen relativ schwächer ansteigen. Zur Berechnung der H_2 und O_2 -Konzentrationen bei H_2 -Produktionsversuchen erfolgte die Eichung anhand der Peakhöhen. Nach jedem Einschalten des Gaschromatographen mussten Eichwerte neu bestimmt werden. Bei Langzeitversuchen wurden jeweils Eichwerte mit Konzentrationen in der Höhe der maximalen H_2 -Produktion bestimmt.

Die Empfindlichkeit bei 120 mA Stromstärke mit Ar (50 ml/min) als Trägergas betrug für H_2 ca 0,1 mV für 4 nl. Für O_2 ist die Empfindlichkeit 179, für N_2 und CO ca. 500 x kleiner als für H_2 , wenn man die Peakhöhen bei gleichen Gasmengen vergleicht.

Die verwendeten Gase stammen von der Firma Carba AG (Ar 48, 99,998%; N_2 45, 99,995 %; CO_2 techn. 99,5%; CO techn. 98 %; He 45, 99,995%; H_2 techn. 99,5%)

5. Ammoniumbestimmung

Ammonium wurde mit Seignettesalz nach einer Vorschrift der Firma Merck bestimmt. Es wurde eine Eichkurve mit bekannten NH_4^+ -Konzentrationen erstellt. Sie verläuft im Bereich von 0,01 - 2 mM linear.

RESULTATE

1. Versuche mit Grünalgen

Eine für Grünalgen typische H_2 -Produktionscharakteristik im Kurzzeitexperiment (geschlossene 13 ml Glasfläschchen) ist in Fig. 2 für Scenedesmus obliquus dargestellt. Die H_2 -Produktionsrate bleibt nur während der ersten Stunde konstant (ca. 0,15 $\mu\text{l}/\text{mg Tg} \cdot \text{h}$), dann ist bereits ein Abflachen festzustellen. Dies ist möglicherweise auf eine zwar geringe, für die H_2 -Produktion aber schädliche O_2 -Konzentration in der Gasphase zurückzuführen. Die Produktionsrate ist bei den verschiedenen untersuchten

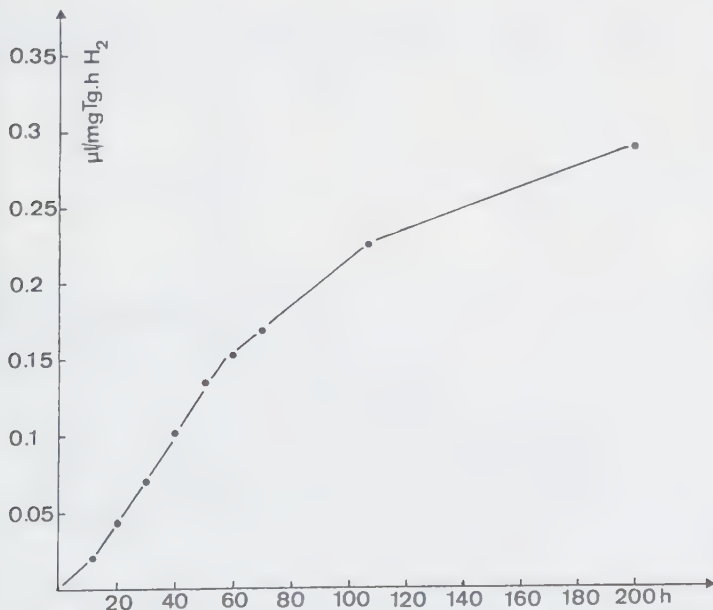


Fig. 2 : H_2 -Produktion mit Scenedesmus in 13 ml Fläschchen (5 ml P_2 -Puffer 0,1 M, pH 7; 11 mg Tg/ml) 22 h mit N_2 im Dunkeln adaptiert, mit N_2 10 min. gespült, dann belichtet (20 W/m^2 , mit Fluoreszenzlampen)

Grünalgenarten sehr unterschiedlich (Tab. 1). Ferner kommt auch zum Ausdruck, dass die H_2 -Produktion stark vom verwendeten Inkubationsmedium abhängig ist. In Phosphatpuffer waren die Zellen bis zu 6 x aktiver als im Wachstumsmedium. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Algen in einem Puffer ohne Mineral-salzzugaben nicht mehr wachsen können und deshalb einen grösseren Teil der zugeführten Lichtenergie in H_2 überführen. Andererseits könnten während des Wachstums Stoffe ausgeschieden werden, die die H_2 -Freisetzung hemmen. Als Kontrollen zeigten Versuche mit Dithionit und Methylviologen (Zugaben, die das System reduzieren und eine volle H_2 -Produktion auch im Dunkeln ermöglichen),

	<u>Chlamydomonas</u>	<u>Scenedesmus</u>	<u>Chlorella</u>	<u>Ankistrodesmus</u>
P-Puffer 0,1 M pH 7	1,1 (15) I	0,15 (5) II	0,13 (1,6) III	0,65 (2,5) IV
ungewaschen im Medium	0,17	0,08		
+ Dithionit 10 mM				
+ Methylvio- logen 5 mM	1,5	0,5		

Tab. 1: H_2 -Produktion mit verschiedenen Grünalgenarten (μ l/mg Tg . h), 60 min. unter H_2 -produzierenden Bedingungen, 15 mg Tg/Ansatz, Inkubationsbedingungen wie in Fig. 1. Adaptationszeiten: Scenedesmus 22 h, Ankistrodesmus 14 h, Chlamydomonas 18 h, Chlorella 12 h, () = höchste Literaturwerte I: (4), II + III: (7), IV: (41)

wieweit die Reaktion durch die Hydrogenase resp. durch die Photosysteme limitiert wird. Mit Dithiothreitol (DTT) und Methylviologen (MeViol) im Versuchsansatz wurde zusätzlich geprüft, wieweit das Photosystem I die limitierende Komponente des H_2 -freisetzenden Prozesses ist. Die bei Tab. 1 in Klammer angegebenen Literaturwerte sind Maximalwerte. Durchschnittliche Werte der

H_2 -Produktion liegen bei ca. $1 \mu\text{l}/\text{mg Tg} \cdot \text{h}$ (7). Um die Langzeitproduktion von Wasserstoff zu verfolgen, wurden Grünalgen im Dunkeln mit N_2 und H_2 (30 ppm) solange begast, bis die H_2 -Konzentration im austretenden Gas konstant war, dann mit N_2 gespült und belichtet. In Fig. 3 ist ein solcher Versuch dargestellt. Er zeigt zusätzlich die Wirkung von 2 verschiedenen Lichtintensitäten und eines Entkopplers der Phosphorylierung (CCCP)

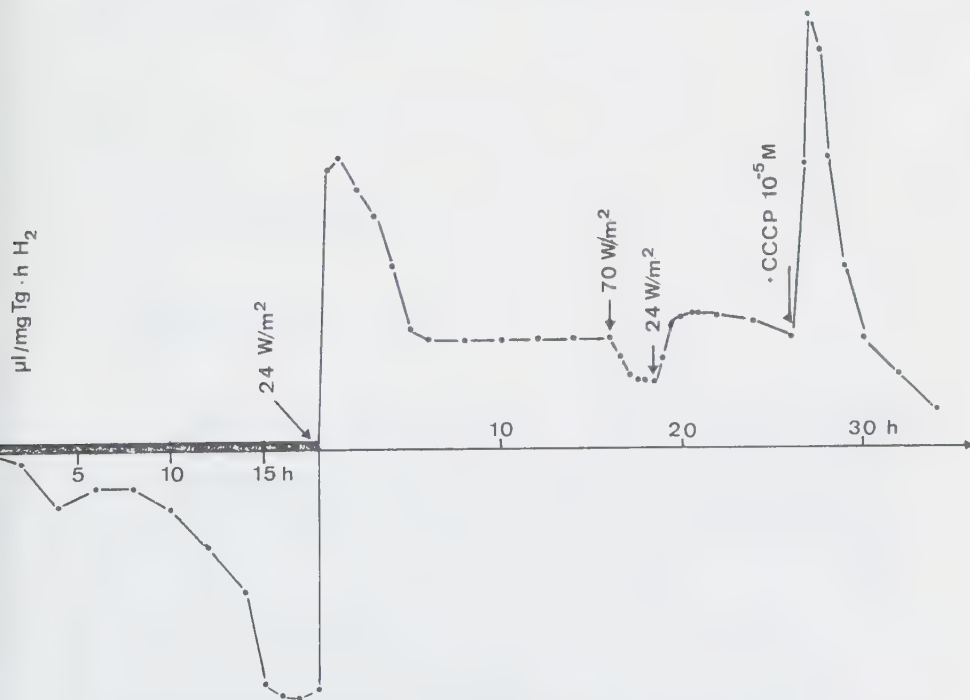


Fig. 3: H_2 -Produktion mit Chlamydomonas in einer 300 ml Waschflasche. Bedingungen: 28°C , Begasung bis 18 h mit N_2 (45 ml/min) und H_2 (1,25 $\mu\text{l}/\text{min}$.) im Dunkeln, nach 18 h mit N_2 (45 ml/min.) begast und belichtet (Quecksilbergühlampe Eye Typ PAR 38, 160 W), total 117 mg Tg in P-Puffer pH 7 0,1M

Bei solchen Langzeitversuchen wurden mit 3 verschiedenen Grünalgen die in Tabelle 2 dargestellten Resultate erhalten.

	max. Aktivität nach	50% aktiv nach	Versuchsabbruch nach
<u>Scenedesmus</u>	3-5 h	5-7 h	14 h (1/5 aktiv)
<u>Ankistrodesmus</u>	1/2	2	10 (0 ")
<u>Chlamydomonas</u>	3	7	30 (1/3 ")

Tab. 2: Stabilität der Wasserstoffproduktion bei verschiedenen Grünalgen. Versuchsbedingungen sh. Tab. 1, Versuchsgefäße: 300 ml Waschflaschen.

Aus Versuchen mit Grünalgen konnten zusammenfassend folgende Erkenntnisse gewonnen werden:

- Die maximale Aktivität betrug 2 µl/mg Tg.h
- Die H₂-Produktion funktioniert nur bei relativ kleinen Lichtintensitäten $\leq 20 - 40 \text{ W/m}^2$
- Optimale Adaptationszeiten liegen für verschiedene Algenarten zwischen 2 und 22 Stunden.
- Von den untersuchten Grünalgen eignet sich Chlamydomonas am besten zur H₂-Produktion.

2. Versuche mit Blaualgen

2.1. Kurzzeitexperimente

Alle Kurzzeitexperimente wurden mit Anabaena cylindrica 1403-2 durchgeführt. Wie Fig. 4 zeigt, ändert sich die H₂-Produktion

Wachstumsdauer	H ₂ -Produktion µl/mg Tg.h				
	ohne Vorinkubation			nach 48 h Vorinkubation unter Ar	
	90 min. Inkubation		48 h Inkubation	90 min. Inkubation	
	ohne Zugaben	mit DT + MeViol	ohne Zugaben	ohne Zugaben	mit DT + MeViol
	5 Tage	0,004	0,02	0,088	0,24
10 Tage	0,001	0,008	0,01	0,068	0,89

Tab. 3: H₂-Produktion von A. cylindrica 1403-2 nach 5 oder 10 Tagen Wachstum, 90 min oder 48 h unter Ar inkubiert oder nach 48 h Inkubation gespült und erneut 90 min. zur H₂ Bestimmung inkubiert. Bedingungen wie Fig 4.

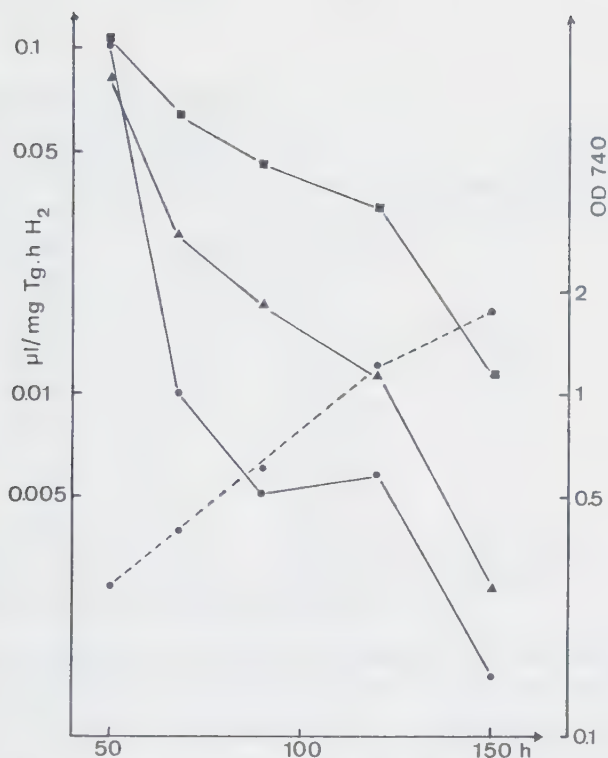


Fig. 4: Altersabhängigkeit der H₂-Produktion bei *Anabaena cylindrica* 1403-2. Die H₂-Produktion wurde während 60 min. bei verschieden alten Zellen im Wachstumsmedium gemessen. Bedingungen für die H₂-Bestimmung: 13 ml Fläschchen, Gasphase Ar, total ca. 15 mg Tg/Ansatz, Lichtintensität: 20 W/m² (Fluoreszenzlampen) ● Ohne Zugaben, ■ mit Dithionit 10 mM und Methylviologen 5 mM, ▲ mit Dithiothreitol 10 mM und Methylviologen 5 mM, --- OD 740.

während des Wachstums stark. Zellen, die 6 Tage unter Wachstumsbedingungen gehalten wurden, hatten eine bis zu 50 x kleinere H₂-Produktionsaktivität als solche, die schon nach 50 h geerntet wurden. Bei der H₂-Freisetzung aus Dithionit und Dithiothreitol ist der Aktivitätsverlust weniger ausgeprägt. Zusätzlich zu dieser Beobachtung zeigt Tabelle 3, dass mit zunehmendem Verweilen der Zellen unter H₂-produzierenden Bedingungen die Wasserstoffproduktion ansteigt. Zur Untersuchung der Physiologie der H₂-Produktion bei Blaualgen wurde das Inkubationsmedium mit verschiedenen Zusätzen versehen.

			+DT +MeViol.	
			$\mu\text{l H}_2/\text{mgTg.h}$	%
Kontrolle	0,0115	100	0,064	100
+ CCCP 2.10^{-5} M	0,0015	13	0,067	104
+ ATP 5 mM	0,0115	100	0,06	94
+ NH_3 1 mM	0,005	43,4	0,065	102
- MeViol	0,012	104		17,6
+ Asc 20 mM	0,0115	100		
+ Gluc 20 mM	0,0185	160		
unter Luft	0,0017	15		

Tab. 4: H_2 -Produktion mit verschiedenen Zugaben im Wachstumsmedium (Bedingungen wie in Fig 4)

Dabei wurde folgendes beobachtet:

- Die Hemmung durch CCCP (Tab. 4) zeigt, dass das System im Gegensatz zur Hydrogenase bei Grünalgen (Fig. 3), von der ATP-Produktion abhängig ist.
- NH_3 und andere Stickstoffverbindungen haben einen stark hemmenden Einfluss. Die geringste Hemmwirkung konnte mit His, Glu und Gly erzielt werden (Tab. 5).

Die beiden oben beschriebenen Effekte sind Hinweise dafür, dass die H_2 -Produktion unter diesen Bedingungen durch die Nitrogenase katalysiert wird.

- Das H_2 -Produktionssystem kann durch Zugabe von reduzierenden Agentien (Dithionit und Methylviologen) stark aktiviert werden und zeigt dann keine Sensitivität mehr gegenüber CCCP, NH_3 und andern Stickstoffverbindungen (Tab. 5). Es wird daher vermutet, dass diese Reaktion durch die reversible Hydrogenase (H_2 -Aufnahme und Abgabe) zustande kommt.

N-Quelle	ul/mg Chl.h H ₂	%	+Dithionit 10 mM +Methylviologen 5mM	%
Kontrolle ohne N	0,299	100	3,38	100
+ His 5 mM	0,209	69,9	3,32	99,2
+ Arg 5 mM	0,087	29,1	3,43	102
+ Gly 5 mM	0,173	57,9	3,37	99,7
+ Glu 5 mM	0,193	64,5	3,33	98,5
+ KNO ₃ 5 mM	0,062	20,7	3,2	94,7
+ NH ₄ ⁺ 5 mM	0,03	10	3,39	100,3

Tab. 5: Effekt von verschiedenen N-Quellen auf die H₂-Produktion (Bedingungen wie in Fig.4)

Die in Kurzzeitexperimenten beobachtete geringe und sehr unterschiedliche H₂-Produktion könnte ebenfalls durch das Vorhandensein einer aktiven Hydrogenase erklärt werden.

2.2. Stickstoffaushungerungsversuche

2.2.1. Prozess unter Standardbedingungen

Insgesamt wurden 4 verschiedene Anabaena-Stämme auf ihre Langzeit-Wasserstoffproduktion untersucht.

Tabelle 6 zeigt Durchschnitts- und Spitzenwerte bei Versuchen unter Standardbedingungen (sh. Methoden). Die angegebenen Spitzenwerte mit 3 Anabaena-Kulturen wurden mit erhöhter Lichtintensität (100 W/m²) erzielt. Die Werte der maximalen H₂-Produktion variieren stark zwischen den verschiedenen Stämmen. Die grösste H₂-Produktionsrate konnte mit Anabaena cylindrica B-629 erreicht werden (36 µl/mg Tg.h). Auch bei der bis zur maximalen H₂-Produktion benötigten Zeit unterscheidet sich A. cylindrica B-629 von den drei andern Stämmen; diese erreichten den Höchststand 5 bis 9 Stunden früher. Die zeitlichen

Organismus	Anzahl Exper.	max. H ₂ -Prod.		Effizienz max.	TH ₂ max	TH ₂ max/2
		µl/mgTg.h	µl/mgChl.h			
<u>A.cy.</u> 1403-2 max.	13	5,1 16	561 3210	0,27 2,6	49,3 47	64,2
<u>A.cy.</u> B-629 max.	4	24,6 36	5043 7400	0,94 1,45	54 45	76,4
<u>A.in.</u> B-381 max.	7	5,7 16	602 1420	0,2 0,32	45,3 42	66
<u>A. flos a.</u>	2	4,8	435	0,62	45	66
<u>Mastigo- cladus</u>	1	-	221		55	89
<u>Plectonema</u>	1	1,84	543	0,031	3 peaks	
<u>Nostoc c.</u>	1	0,72	25	0,007	32	35

Tab. 6: Durchschnitts- und Spitzenwerte der H₂-Produktion mit verschiedenen Blaualgenstämmen unter Stickstoffaushungerungsstandardbedingungen.

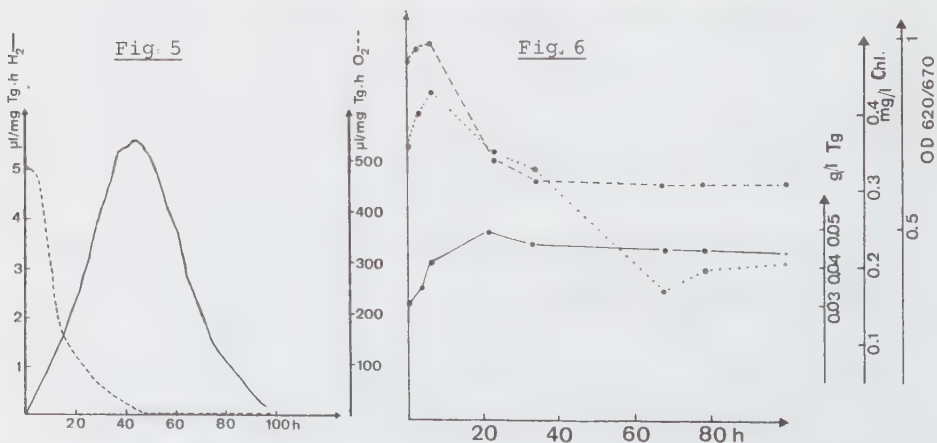


Fig. 5: H₂-Produktion während der N₂-Aushungerung unter Standardbedingungen (sh. Methoden) mit A. cylindrica 1403-2

Fig. 6 Trockengewicht —, Chlorophyllgehalt --- und Pigmentverhältnis OD 620/670... unter N₂-Aushungerungsstandardbedingungen mit A. cylindrica 1403-2

Abweichungen des H_2 -Produktionsverlaufes während der N -Aus-hungerung sind bei Versuchen mit denselben Stämmen gegenüber den zeitlichen Abweichungen der maximalen H_2 -Freisetzung sehr gering. Fig. 5 zeigt einen typischen Langzeitversuch unter Stan-dardbedingungen mit einer 5 Liter-Kultur mit der Blaualge Ana-baena cylindrica B-381.

Parallel zur Untersuchung über die durch den Stresseffekt bei N-Mangel ausgelöste Steigerung des H_2 -Produktionspotentials, wurde mittels verschiedener Methoden die Physiologie der Zellen zu erfassen versucht (H_2 und O_2 -Produktionsmessungen, Bestimmung des Heterocystengehaltes, pH-und Biomasseverlauf, elektronenmik-rooskopische und spektroskopische Untersuchungen).

Während der Zeit bis zum Erreichen des Maximums der H_2 -Frei-setzung konnten folgende Beobachtungen gemacht werden:

- Mit zunehmender H_2 -Produktion sinkt die O_2 -Freisetzung (bis zu 1-5 % des Anfangswertes). Im Zeitpunkt der höchsten H_2 -Ab-gabe kann das Verhältnis H_2/O_2 bis zu ca. 2/1 zunehmen, was theoretisch für die Wasserspaltung zu erwarten ist.
- Mit zunehmender H_2 -Produktion werden die Pigmente der Kultur verändert. Schon nach ca. 12-24 h ohne Stickstoff werden die Zellen gelb. Anhand des zu verschiedenen Zeiten aufgenommenen Spektrums kann gezeigt werden, dass der Anteil des blauen Pig-mentes Phycocyanin drastisch vermindert wird (Fig. 6). Daneben wird, jedoch in geringerem Masse, auch Chlorophyll abgebaut.
- Deutliche Änderungen im Verhältnis Heterocysten/vegetative Zellen werden beobachtet. Es kann im Laufe der N-Aushungerung von 1/15-20 bis zu 1/3-5 vergrößert werden.
- Zwei deutliche Veränderungen in der Ultrastruktur können fest-gestellt werden: im Verlauf der Begasung mit $Ar + CO_2$ werden die interthylakoidalen Räume elektronentransparent und es tritt eine starke Vakuolisierung der Thylakoidmembranen ein. Man kann annehmen, dass sich Struktur und Inhalt der Phycobili-somen verändern oder aufgebraucht werden (als N-Reserve). Nach 44 h zeigen die Cyanophycingranula Abbauspuren.

Elektronenoptische Aufnahmen:

Vier Stadien während der N-Aushungerung (0 bis 44 h) mit Anabaena cylindrica 1403-2; Fixierung mit BaMnO_2 ; der schwarze Strich entspricht 1 μm , dies gilt für alle Abbildungen.

Abb. 1: Kontrolle, Kultur vor der anaeroben Begasung: T = Thylakoide, P = Polyhedral Bodies (Polyphosphate), L = Lipidvakuolen, W = Wand; x 24 000

Abb. 2: 22 h Ar + CO_2 Begasung. C = Cyanophycingranula, T = Thylakoide, Pfeil: Elektronentransparente Stellen; x 20 000

Abb. 3: 35 h Ar + CO_2 Begasung. C = Cyanophycingranula, T = vakuolisierte Thylakoide; x 25 000

Abb. 4: 44 h Ar + CO_2 Begasung. Bezeichnungen wie bei Abb. 3; x 20 000

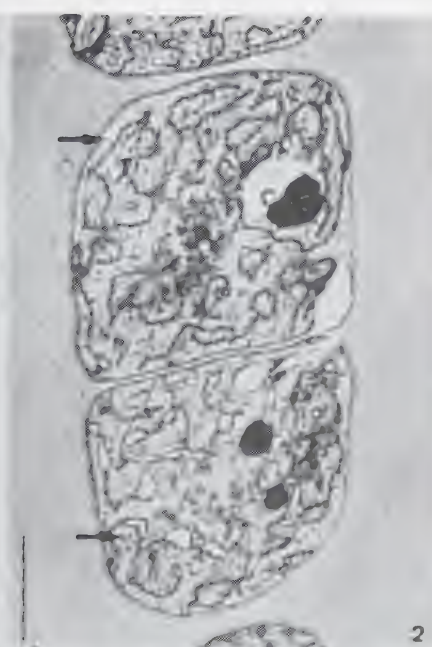
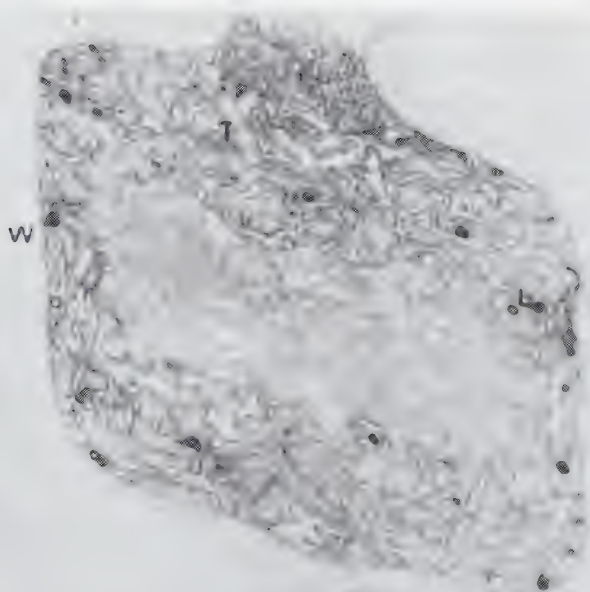
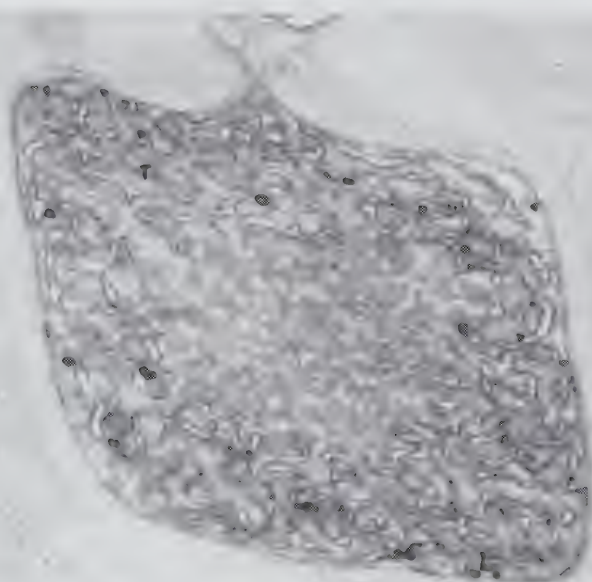


Abb. 5: Heterocyste vor der Begasung mit Ar + CO₂. T = Thylakoide in charakteristischer netzartiger Verteilung, L = Lipidvakuolen, W = Wand; x 31 000

Abb. 6: Heterocyste nach 44 h Ar + CO₂ Begasung. Bezeichnungen wie bei Abb. 5; x 31 000



5



6

Die Heterocysten zeigen keine Veränderungen der Substruktur (siehe elektronenoptische Aufnahmen S.26-28).

- Während des Verlaufes der N-Aushungerung erfährt die Biomasse zunächst einen Zuwachs, was auf die Ueberführung von Reservestoffen (Stickstoffverbindungen) zusammen mit neufixiertem CO_2 in Zellmasse hindeutet (Fig. 6).
- Während der N_2 -Aushungerung sinkt der pH von 7,8 bis auf 6,7 bis 7,1; dies deutet darauf hin, dass während dieses Prozesses Protonen ausgeschieden werden (z.B. Aminosäuren, als Abbauprodukte des Phycocyanins), da der pH normalerweise unter Wachstumsbedingungen mit N_2 als Stickstoffquelle steigt.

Der Prozess der N-Aushungerung ist reversibel. In einem Versuch wurde nach 35-stündiger Ar-Begasung (+ 1% CO_2) wieder mit Luft begast. Anhand von EM-Bildern ist ersichtlich, dass bereits nach 6 h die für aerob gewachsene Zellen typischen intrazellulären Lamellenstrukturen wieder sichtbar werden und nach 38 h die leerscheinenden interthylakoidalen Räume nicht mehr vorhanden sind. Nach 60 h Belüftung konnten keine elektronenoptische Unterschiede gegenüber zuvor nicht ausgehungerten Algenzellen mehr festgestellt werden. Auch die Phycobilisomenstruktur wird wiederhergestellt. Mit diesem Vorgang gekoppelt, ändert sich auch die Farbe der Kultur von gelb zurück zu blaugrün.

Die genauere Kenntnis über den Vorgang der N-Aushungerung diene als Grundlage für eine manipulierte Aufrechterhaltung einer hohen H_2 -Freisetzungsaktivität, die anschliessend mit verschiedenen Methoden untersucht wurde.

Aufgrund der aufgezeigten Resultate von Vorversuchen mit Grün- und Blaualgen, konnte der Schluss gezogen werden, dass sich Blaualgen besser zur Wasserstoffproduktion eignen als Grünalgen, da sie

- höhere maximale H_2 -Produktion (ca. 30 gegenüber 2 $\mu\text{l}/\text{mg Tg.h}$)
- grössere Stabilität (einige Tage gegenüber einigen Stunden)

- kleinere Sauerstoffempfindlichkeit (Schutz der Nitrogenase durch Heterocysten)
- und grössere Toleranz gegenüber hohen Lichtintensitäten zeigen.

Es wurde deshalb in der Folge nur noch mit Blaualgen gearbeitet und die Einflüsse der nachstehenden Parameter auf die H_2 -Bildung während der Stickstoffaushungierung unter Standardbedingungen untersucht.

2.2.2. Lichtintensität

Fig. 7 zeigt die Abhängigkeit der H_2 -Produktion von der Lichtintensität während des N -Aushungerungsprozesses. Es wurden 3

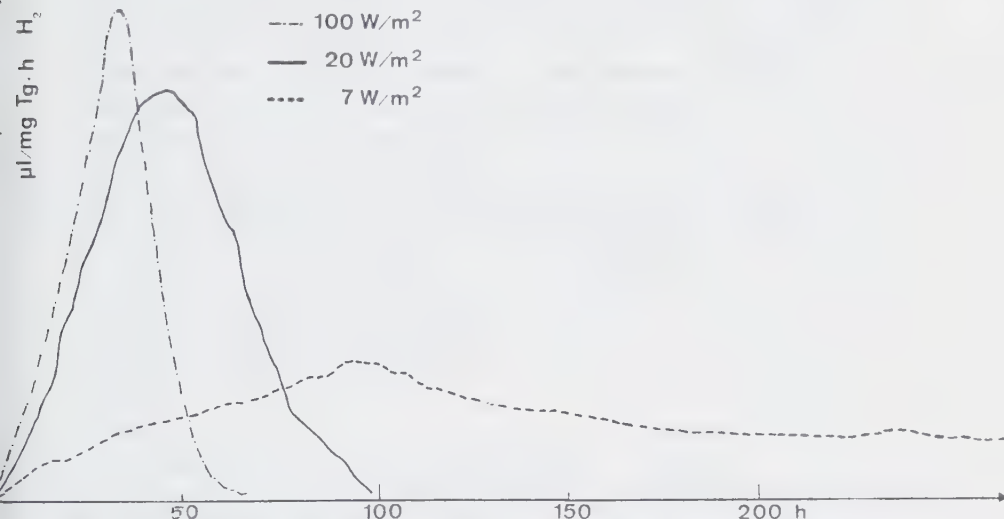


Fig. 7: Abhängigkeit der H_2 -Produktion von der Lichtintensität.

Legende zu Fig. 7-16: H_2 -Produktion während der N-Aushungierung mit Anabaena cylindrica (in Fig. 11b und 12b mit Anabaena flos aquae und Fig. 15 mit Nostoc und Plectonema) Aerobe Anzucht; T_0 : Begasung mit ca. 30 ml/min Ar + 1% CO_2 ; Belichtung 20 W/m^2 ; 5 Liter Kulturen mit 20 - 100 mg Tg/l (0,1 - 1 mg Chl./l) Gaschromatographische H_2 -Bestimmung, Proben alle 5-10 min. mit automatischem Ventil injiziert. Besondere abweichende Bedingungen sind in Figuren angegeben.

verschiedene Lichtintensitäten (100W/m^2 , 20W/m^2 und 7W/m^2) verwendet. Mit hoher Lichtstärke wird die maximale H_2 -Produktion schon nach kurzer Zeit erreicht, während bei Schwachlicht eine geringere Aktivität, welche jedoch über längere Zeit (ca. 300 h) stabil bleibt, zu beobachten ist. Die Gesamtmenge des freigesetzten Wasserstoffs bleibt sich bei den 3 verwendeten Lichtintensitäten ungefähr gleich.

2.2.3. Tag-Nacht Rhythmus

Um annäherungsweise Aufschluss über die H_2 -Produktion bei natürlichen Lichtverhältnissen zu erhalten, wurde nach Erreichen der maximalen H_2 -Produktionsaktivität bei N-Aushungerungsversuchen auf ein Tag-Nacht Rhythmus (15h/9h) umgestellt. Fig. 8 zeigt, dass die H_2 -Produktion im Gegensatz zu Experimenten mit kontinuierlicher Belichtung auch nach 250 Stunden noch stattfindet; es ist jedoch zu beachten, dass bereits nach 100 h nur noch $\frac{1}{3}$ bis $\frac{1}{2}$ der maximalen Aktivität vorhanden ist. Daneben kommt in diesen Experimenten deutlich zum Ausdruck, dass die H_2 -Freisetzung strikt lichtabhängig ist.

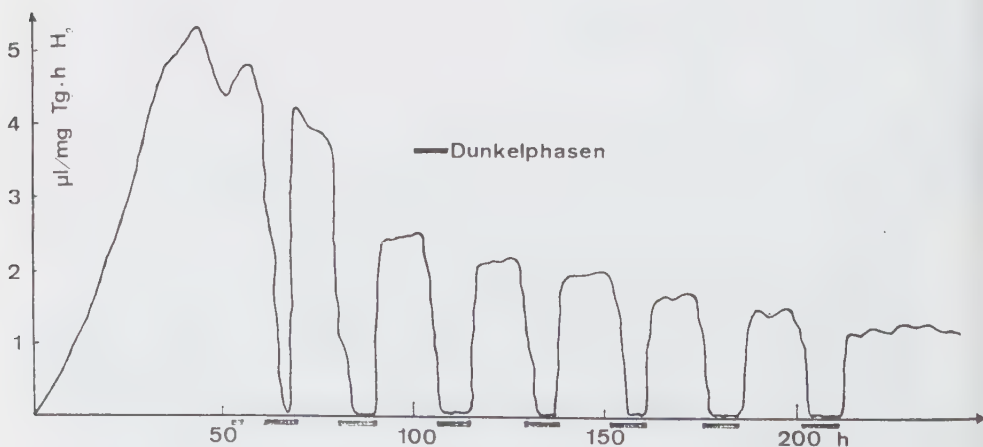


Fig. 8: H_2 -Produktion im Tag-Nacht Rhythmus

2.2.4. pH-Wert

Während des N-Aushungerungsprozesses ändert sich der pH des Mediums (5 mM P-Puffer, pH 7,8) stark. Im Laufe von 4 bis 5 Tagen sank der pH von 7,8 auf 7,1 bis 6,7. Dies entspricht einer Säureproduktion von 0,02 $\mu\text{m HCl/mg Tg}$ oder 1,25 $\mu\text{m HCl/mg Chlorophyll}$ (Mittel aus 3 Versuchen). Wird zu Beginn des Aushungerungsversuches mit NaOH ein pH von 8,8 eingestellt, so ist gegenüber der Kontrolle mit einem Anfangs-pH von 7,8 keine unterschiedliche H_2 -Freisetzung zu beobachten. Mit der Zugabe von 100 mM Carbonatpuffer war es möglich, den pH-Wert von anfangs 9,55 nach 4 Tagen auf 9,22 zu halten. Auch diese Behandlung änderte den Verlauf der H_2 -Produktion nicht. Aus diesem Versuch wird auch ersichtlich, dass die üblicherweise verwendete 1%-ige CO_2 -Zugabe zum Begasungsgemisch völlig ausreicht, um den CO_2 -Bedarf zu decken und das pH von geringer Bedeutung für die H_2 -Produktion ist. Auch ein pH Wert von 6 zu Beginn der Aushungerung hat keinen negativen Einfluss auf den H_2 -Produktionsverlauf. Bei diesem Versuch änderte sich der pH während der beobachteten Zeitperiode nicht mehr. Verwendete man jedoch ein Aushungerungsmedium mit einem pH von 5, so wurde nur noch eine geringe maximale H_2 -Bildung (0,0058 $\mu\text{l/mg Tg.h}$) mit einer geringen Energieumwandlungseffizienz (0,00061%) festgestellt.

2.2.5. Temperatur

Der H_2 -Produktionsverlauf wurde unter Standardbedingungen bei 15, 22, 29, 35 und 40 $^{\circ}\text{C}$ gemessen. Fig. 9 zeigt, dass die Temperatur sowohl auf die Aktivität wie auch auf die Stabilität einen grossen Einfluss hat. Ähnlich wie bei der Lichtabhängigkeit, wirken auch hier schwächere Bedingungen aktivitätssenkend und stabilitätserhöhend. Bei 40 $^{\circ}\text{C}$ ist jedoch nur noch eine geringe Aktivität und ein völliger Stillstand der Wasserstoffproduktion schon nach 6 h feststellbar.

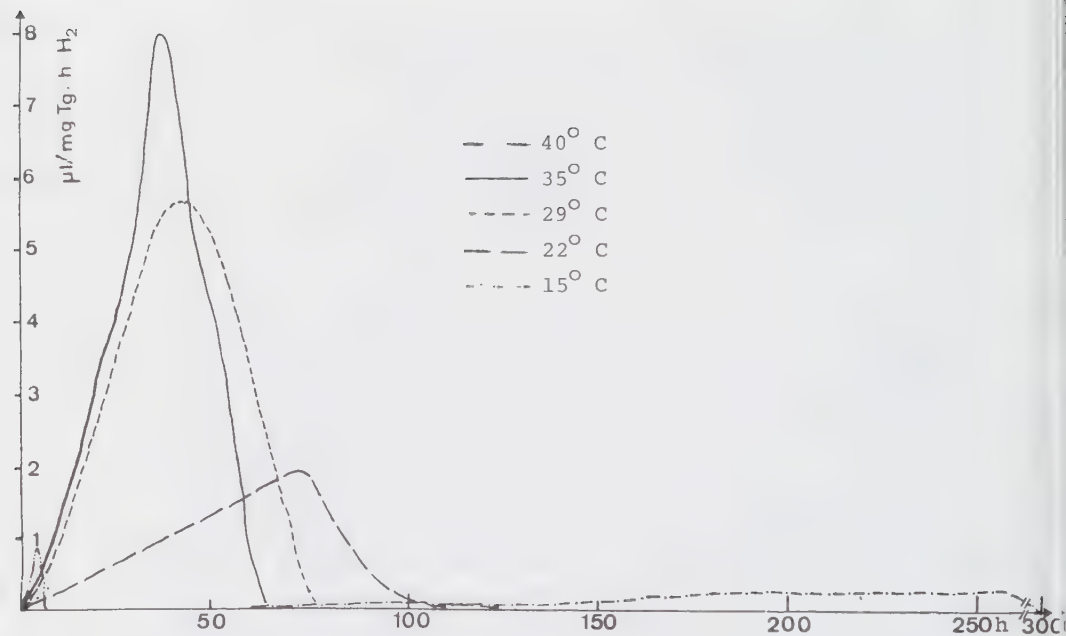


Fig. 9: Temperaturabhängigkeit der Wasserstoffproduktion während der Stickstoffaushungierung.

2.2.6. Rührdrehzahl

Ergebnisse von Versuchen mit Rührdrehzahlen von 100 bis 500 Upm zeigten keine signifikanten Unterschiede in Aktivität und Stabilität. Unter 100 Upm konnte nicht gerührt werden, da dadurch die starke Verklumpung und das Anhaften der Zellen an Glasoberflächen nicht verhindert werden konnte. Bei einem Versuch mit 700 Upm konnte eine um 5 h verkürzte TH_2 max und eine um 9 h geringere TH_2 max $\frac{1}{2}$ festgestellt werden. Bei Fermentorversuchen (170 und 1700 ml), wo mit 900 bis 1500 Upm und einer zusätzlich erhöhten mechanischen Beanspruchung durch den Einsatz von Schikanen im Kulturgefäß gearbeitet wurde, konnte dieser Stabili-

tätsverlust ebenfalls beobachtet werden. Es wurde auch getestet, wie sich eine Veränderung der Rührdrehzahl von 300 auf 600 Upm während einer konstanten Phase der H_2 -Produktion in einem N-Aus-hungerungsversuch auswirkt. Nach einer Stunde konnte eine um 80 % erhöhte H_2 -Produktionsrate festgestellt werden. Nach 5 h pendelte sich die H_2 -Produktion auf ein Niveau ein, das nur noch 17 % über dem Anfangswert lag. Dieser kurzfristige H_2 -Ausstoss ist wahrscheinlich eine Folge des erhöhten Gasaustausches durch eine bessere Durchmischung bei höherer Rührdrehzahl.

2.2.7. Begasungsrate und Gaszusammensetzung

Die Standardbedingungen für die Begasung der Kulturen waren Ar/CO_2 (99/1) mit einer Flussrate von 30 - 40 ml/min. Durch die Erhöhung des CO_2 -Anteiles auf 5% konnte kein veränderter Verlauf der H_2 -Bildung erzielt werden. Bei einem Versuch wurde nach 34 stündiger Begasung mit Ar/CO_2 auf CO_2 ohne Edelgas umgestellt (gleiche Flussrate). Die H_2 -Bildungsrate sank darauf sehr schnell (nach 1 1/2 h auf die halbe Höhe; nach 7 h war kein H_2 im ausströmenden Gas mehr feststellbar). Die Hemmung durch CO_2 konnte aufgehoben werden, indem nach 15 h CO_2 -Begasung wieder auf Ar/CO_2 umgestellt wurde. Die H_2 -Produktion stieg daraufhin sehr stark an und erreichte nach 15 h ein Maximum, das jedoch ca. 1/2 unter demjenigen nach 34 h Stickstoffaushungerung lag. Eine Kultur wurde mit einer grösseren Flussrate (150 ml/min.) mit Ar/CO_2 (99/1) begast. Das H_2 -Produktionsmaximum wurde dadurch schon nach 35 h und die TH_2 max 1/2 nach 46 h erreicht. Bei der H_2 -Bildungsrate wurde ein etwas geringerer Wert als bei Kontrollversuchen beobachtet. Die maximale Effizienz betrug bei diesem Versuch nur 0,05%. Mit geringen Begasungsraten (1-2 ml/min.) musste keine Einbusse in Bildungsrate und Effizienz in Kauf genommen werden.

Anscheinend wird die Kultur unter diesen Bedingungen genügend mit CO_2 versorgt. Auch die durch das langsame Abführen der gebildeten Gase relativ hohe O_2 -Konzentration (ca. 1% während des H_2 -Produktionsmaximums) hatte keinen sichtbaren negativen Einfluss auf die H_2 -Freisetzung. Die Ausbeute lag in diesem Versuch sogar 51% über dem durchschnittlichen Kontrollwert. In einem Versuch mit zusätzlich erhöhter Zelldichte konnten noch günstigere Effizienzwerte (max. 2,6%) bei gleichbleibender Produktionsrate erreicht werden (sh. 2.2.8.)

2.2.8. Zelldichte

Um eine möglichst homogene Lichtverteilung im 5 l Kulturgefäß zu erhalten, wurden alle Screeningversuche mit relativ kleinen Zelldichten (0,02 bis 0,1 g/l) durchgeführt. Mit der Erhöhung der Zelldichte (0,13, 0,75 und 1,91 g/l) wurden eine Aenderung der Lichtausbeute und zT. auch der Stabilität der H_2 -Produktion erreicht. Mit 0,75 g/l zeigte sich bereits eine stark erhöhte Effizienz von maximal 0,88%. Mit 1,91 g/l bei einer Begasungsrate von 1-2 ml/min Ar/CO_2 (99/1) wurde sogar ein maximaler Wert von 2,6% erhalten. Während 35 bis 180 h nach Beginn der Aushungerung betrug die Effizienz über 1%. Die halbmaximale H_2 -Produktion wurde erst nach 176 h unterschritten. Durchschnittlich betrug die Umsetzungsausbeute von Lichtenergie in H_2 während 310 h 0,95%. Möglicherweise ist dies dadurch zu erklären, dass die Zellen bei grosser Kulturdichte in einem gerührten Gefäß nur während kurzer Zeit Licht erhalten, dies jedoch für die H_2 -Produktion genügt. Dadurch geht kein Licht verloren und die Ausbeute pro Fläche wird stark erhöht. Jeffries und Leach (42) erreichten durch die Verwendung von intermittierendem Licht mit einem Rhythmus von 10 s Licht und 10 bis 20 s dunkel eine 1,35 bis 1,7 fache Steigerung der H_2 -Produktionsrate.

Die Sauerstoffkonzentration im Gasgemisch beim Versuch mit 1,91 g/l Tg betrug während der maximalen H_2 -Produktion 20,5%, diejenige von Wasserstoff 11,5%. Auch hier zeigt sich demnach wieder eine erstaunliche Sauerstoffunempfindlichkeit.

2.2.9. Mediumzusammensetzung

Die Erhöhung der Fe-Konzentration im Aushungerungsmedium über $2,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ hatte keinen Einfluss auf die Wasserstofffreisetzung. Jeffries (29) konnte mit der Erhöhung der Fe-Konzentration von 0,95 auf $9,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ eine beträchtliche Steigerung (ca 2x) der H_2 -Produktionsrate während der N-Aushungerung erzielen. Durch das Heraufsetzen der EDTA-Konzentration von $2,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ auf $25 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ erreichte ich eine Stabilitätserhöhung. TH_2 max. $\frac{1}{2}$ konnte dadurch auf 150 h erhöht werden. Die H_2 -Bildungsrate lag bei diesem Versuch jedoch 30 % unter den Kontrollwerten. Kessler (43) erreichte durch Zugabe von EDTA zum Kulturmedium von Grünalgen eine Steigerung des H_2 -Metabolismus. Durch diese Massnahme konnten die anaerobe Adaptationsphase verkürzt und die Rate und Stabilität der H_2 -Aufnahmerate vergrößert werden. In meinen Versuchen bewirkte die Zugabe von 75 mM NaCl ein zeitliches Vorverlegen der maximalen H_2 -Produktionsrate von 49 auf 36 h. Es wurde auch untersucht, inwiefern ins Medium ausgeschiedene Stoffe der Blaualgen den H_2 -Produktionsverlauf während der Stickstoffaushungerung beeinflussen könnten. Dazu wurde das Medium einer Kultur nach 80 h N-Aushungerung unter Standardbedingungen von den Zellen durch Zentrifugation getrennt und erneut mit aerob gewachsenen frischen Zellen beimpft und einer N-Aushungerung unterworfen. Alle Messresultate (max. H_2 -Produktionsrate, Zeit der maximalen und $\frac{1}{2}$ maximalen H_2 -Produktion und Effizienz) stimmten mit denjenigen von Kontrollversuchen überein. Aufgrund dieser Resultate wäre es möglich, eine Blaualgenkultur unter H_2 -bildenden Bedingungen über längere Zeit in Funktion zu erhalten, in-

dem entweder kontinuierlich oder zu verschiedenen Zeiten frische Zellen zugeführt würden. Aufgrund des zeitlichen Verlaufes der H_2 -Bildung könnte eine geeignete Dichte und Zuführrate von frischen Zellen berechnet werden.

2.2.10. Wirkung von O_2

Um den Einfluss von O_2 ausschliessen zu können, wurden Kulturen mit Glukose 10 mM und Glukose-Oxydase 1000 mg/5 l (techn., aus Schimmelpilz, Fluka AG, Buchs SG) zum Aushungerungszeitpunkt t_0 und t_{30} versehen. Im Vergleich zu Kontrollversuchen konnte mit solchen O_2 -freien Kulturen keine Produktions- und Effizienzerhöhung erzielt werden. Es wurde jedoch eine deutliche Stabilisierung erreicht. H_2 max lag bei Zugabe bei t_0 bei 68 h und bei Zugabe bei t_{30} bei 74 h (unter Standardbedingungen bei 49 h); H_2 max 1/2 bei der Zugabe bei t_0 bei 110 h und bei t_{30} bei 160 h (unter Standardbedingungen bei 64 h). Inwiefern Glukose von den verwendeten Blaualgen als Substrat verwendet werden kann, konnte durch diese Versuche nicht geprüft werden. Glukose trägt jedoch nicht zu einer Erhöhung der H_2 -Bildung bei, was bei einer Verwertung als Energiequelle erwartet werden könnte. Auch die unter 2.2.8 und 2.2.9 beschriebenen Versuche, wobei mit grossen Zelldichten und kleinen Belüftungsraten gearbeitet wurde, beides Massnahmen, welche zu einer erhöhten Konzentration an gebildetem O_2 führen, zeigen, dass die H_2 -Produktion mit Anabaena cylindrica unter N-Aushungerungsbedingungen relativ sauerstoffunempfindlich ist. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass das H_2 -produzierende Enzymsystem, die Nitrogenase, durch ihre Lokalisation in den Heterocysten von O_2 geschützt ist.

Wenn die Kulturen mit Dithionit (5 mM) und Methylviologen (1 mM) behandelt wurden, wurde bei der Zugabe beim Start der N-Aushungerung nur ein geringer H_2 -Ausstoss (max. 0,023 μ l/mg Tg . h nach 18 h) mit einer Effizienz von 0,0025 % beobachtet. Wenn dieselben Zugaben nach 24 h Aushungerung verabreicht wurden, sank die H_2 -Bildungsrate 2 h nach Zugabe auf die Hälfte und stellte sich nach weiteren 3 h auf einen Wert von 0,018 μ l/mg Tg . h ein. Nach

Daday (24) wird durch die Zugabe von Dithionit und Methylviologen die Nitrogenase ausgeschaltet und die H_2 -Bildung wird allein durch die Hydrogenasereaktion katalysiert. Diese Methode eignet sich daher nicht, den Einfluss von Sauerstoff auf die Nitrogenase - katalysierte H_2 -Bildung in vivo zu studieren.

2.2.11. Stickstoffzugaben

2.2.11.1. Ammoniumzugaben

Um den Abfall der H_2 -Freisetzungsaktivität nach ca. 2-3 Tagen in N-ausgehungerten Zellen zu verhindern oder zumindest abzuschwächen, wurde den Kulturen Stickstoffverbindungen in verschiedener Form und Konzentration zugegeben. Fig. 10 zeigt, dass schon mit sehr geringen NH_4^+ -Konzentrationen eine starke Hemmung der H_2 -Abgabe stattfindet. Zugaben von mehr als $5 \cdot 10^{-5} M NH_4Cl$ lassen die H_2 -Produktion rasch abnehmen.

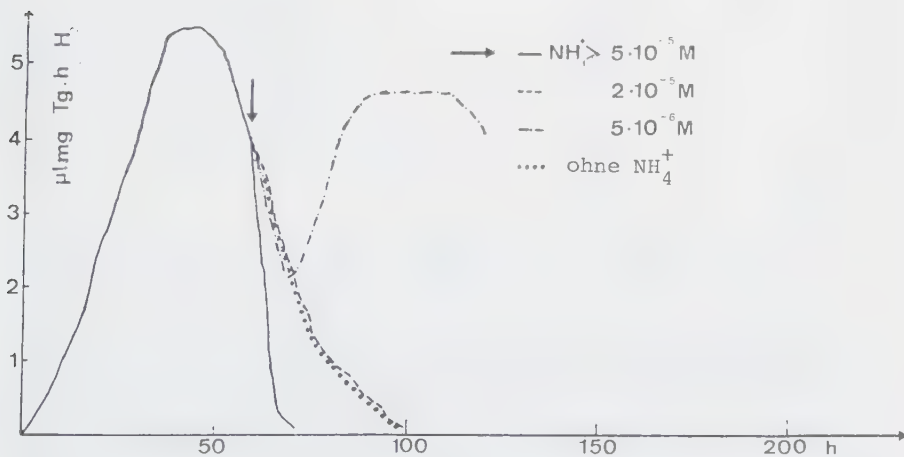


Fig. 10: Hemmwirkung von Ammonium auf die H_2 -Freisetzung

2.2.11.2. Wirkung von MSO auf die H_2 -Produktion bei NH_3 -reprimierten Zellen.

MSO blockiert den Einbau von NH_3 in Aminosäuren, indem es als Glutamin-Synthetase-Hemmstoff wirkt (44,28). Dadurch wird die negative Interaktion von NH_3 mit der Nitrogenase ausgeschaltet. MSO kann hier den negativen Einfluss selbst relativ geringer NH_3 -Mengen auf die H_2 -Bildung nicht über längere Zeit verhindern (Fig. 11a und b).

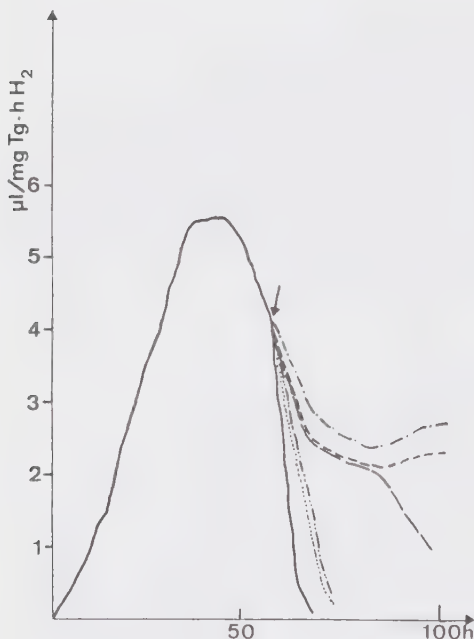


Fig. 11a: Effekt von verschiedenen MSO- und NH_4^+ -Konzentrationen auf die H_2 -Produktion bei Zugabe nach 60 h N-Aushungerung

- NH_4^+ $10^{-4}M$ + MSO $10^{-6}M$
- · - NH_4^+ $2 \cdot 10^{-5}M$ + MSO $10^{-6}M$
- - - NH_4^+ $5 \cdot 10^{-5}M$ + MSO $10^{-6}M$
- · · - NH_4^+ $5 \cdot 10^{-5}M$ + MSO $10^{-5}M$
- ... NH_4^+ $5 \cdot 10^{-4}M$ + MSO $10^{-4}M$
- - - MSO $10^{-6}M$

MSO ($10^{-6}M$) zeigt nur gerade mit NH_4^+ -Konzentrationen von $2 \cdot 10^{-5}$ und $5 \cdot 10^{-5}M$ bei Zugabe nach 60 h Aushungerung einen H_2 -produktionsfördernden Einfluss. Durch die Erhöhung der MSO-Konzentration (10^{-5} und $10^{-4}M$) bei einem NH_4^+ /MSO Verhältnis von 5 erreicht man keine Stabilisierung der H_2 -Freisetzung (Fig 11 a). MSO ($10^{-6}M$) allein bewirkt während kurzer Zeit (zwischen 67 und 72 h Aushungerung) eine Verlangsamung des H_2 -Produktionsabfalles..

Auch die MSO- Zugabe vor dem Erreichen der maximalen H_2 -Produktionsaktivität (nach 27h) vermag die Hemmwirkung von NH_4^+ ($5 \cdot 10^{-4} M$), nach 60 stündiger N-Aushungerung zugegeben, nicht zu eliminieren. (Fig 11b).

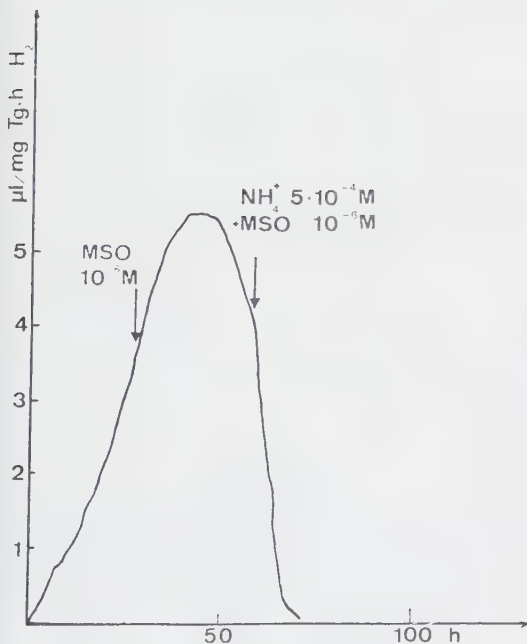


Fig 11b: Wirkung von MSO auf die H_2 -Produktion bei Zugabe nach 27 h Aushungerung

Gibt man jedoch relativ hohe NH_4^+ -Konzentrationen ($10^{-4} M$) schon nach 24 h Aushungerung zu, so ergibt sich ein grosser Unterschied in der H_2 -Freisetzung zwischen Kulturen mit und ohne MSO ($10^{-6} M$, nach 24 h zugegeben). Währenddem nach 24 h Aushungerung ohne MSO ein vorübergehendes Absinken der H_2 -Bildungsrate zu beobachten ist, tritt dies mit MSO erst nach 64 h ein. Zusätzlich wird das Produktionsmaximum erst nach 110 h (ohne MSO nach 70 h) erreicht. Die halbmaximale Aktivität wird ohne MSO nach 82 h, mit MSO erst nach 155 h erreicht (Fig. 11c).

Fig 11c: H_2 -Produktion bei Zugabe von NH_4^+ oder NH_4^+ + MSO schon nach 24 h Aushungerung

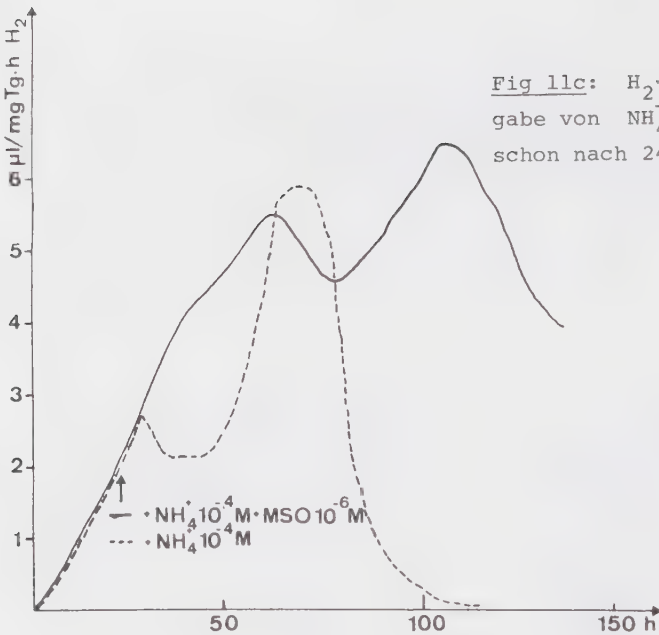
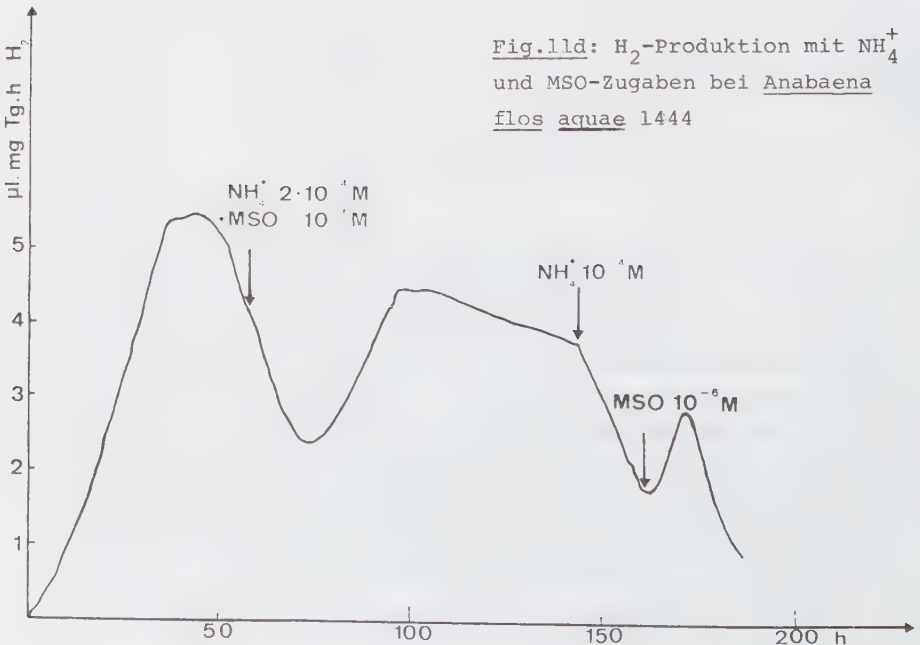


Fig.11d: H_2 -Produktion mit NH_4^+ und MSO-Zugaben bei *Anabaena flos aquae* 1444



Wie Fig. 11d zeigt, kann das Verhalten gegenüber N-Verbindungen bei verschiedenen Anabaena-arten unterschiedlich sein. Im Gegensatz zu Versuchen mit Anabaena cylindrica 1403-2 (Fig. 11a-e), zeigt Anabaena flos aquae 1444 mit $2 \cdot 10^{-4} \text{ M NH}_4\text{Cl}$ und MSO , 10^{-6} M , eine vorübergehende Reaktivierung der H_2 -Produktion nach 70 h.

2.2.11.3. Aminosäuren

Zur Verlängerung der H_2 -Produktion wurden aufgrund von Vorversuchen (Tab 5) auch Aminosäurezugaben ausprobiert. Auch hier müssen die Konzentrationen sehr gering sein, um ein verstärktes Absinken der H_2 -Abgabeaktivität zu verhindern (Fig 12a und 12b)

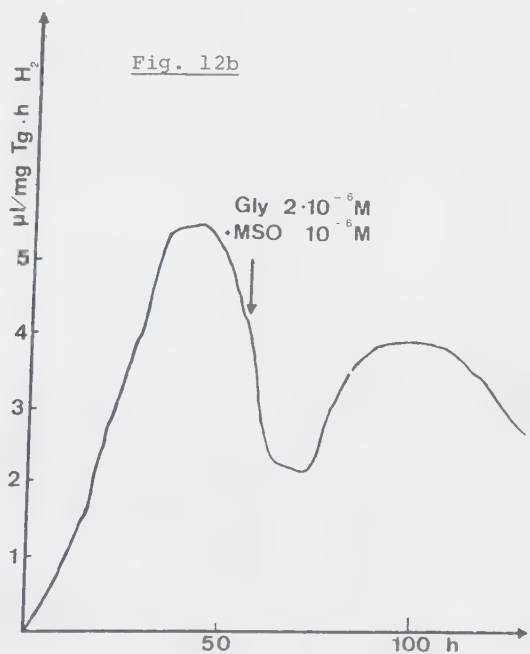
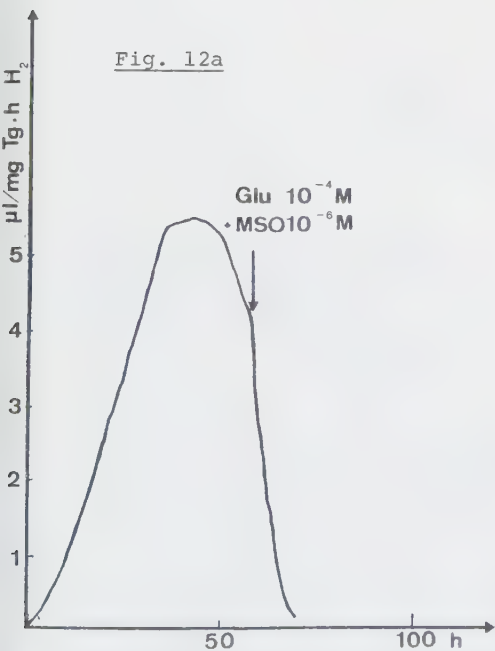


Fig. 12 H_2 -Produktion während der N-Aushungerung mit Zugabe von Aminosäuren (Glu und Gly) zusätzlich mit MSO. Fig 12a mit Anabaena cylindrica 1403-2 und Fig 12b mit Anabaena flos aquae 1444.

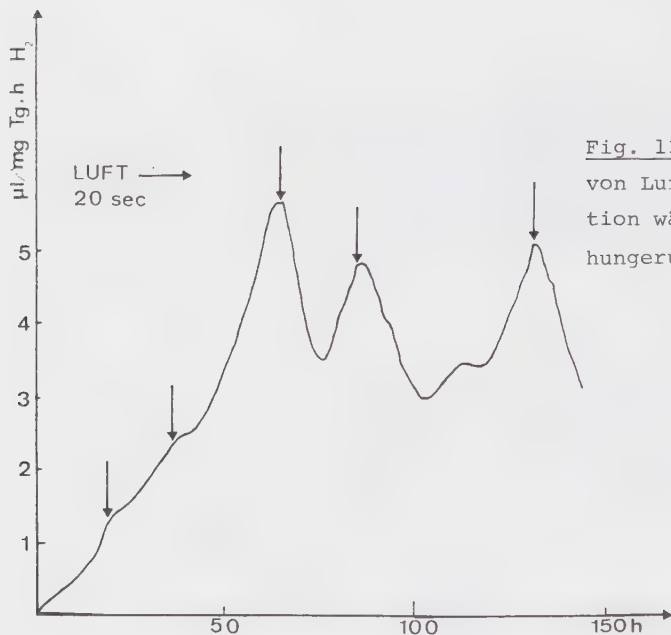


Fig. 13: Wirkung der Zugabe von Luft auf die H_2 -Produktion während der N-Aus-hungerung.

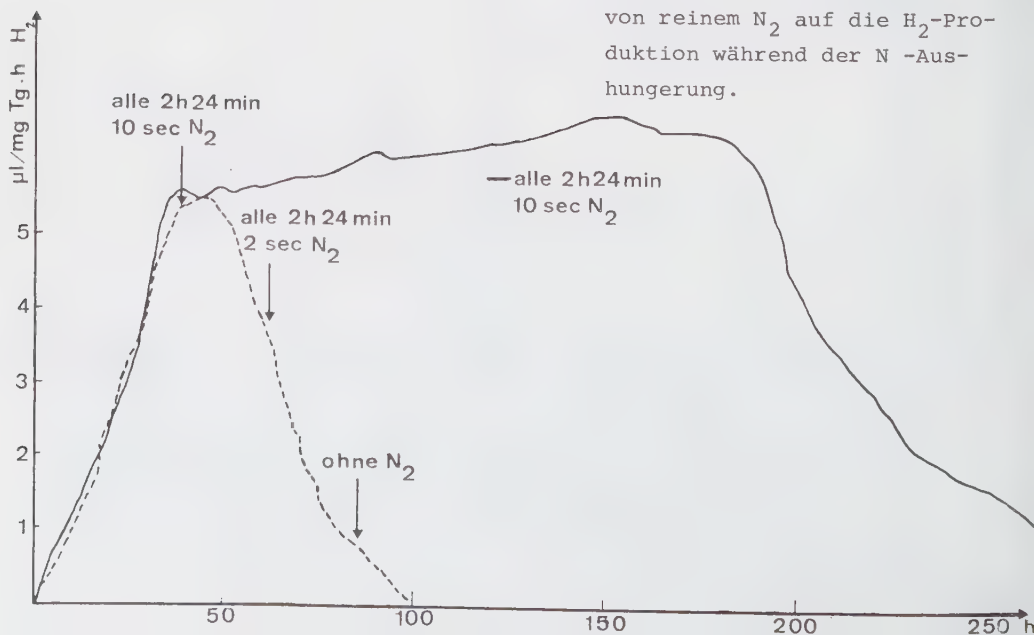


Fig. 14: Wirkung der Zugabe von reinem N_2 auf die H_2 -Produktion während der N -Aus-hungerung.

2.2.11.4. Luft und N_2

Die einfachste Möglichkeit zur Deckung des N-Mangels für den Grundstoffwechsel der Zellen, wäre das Zudosieren von Luft. Zu verschiedenen Zeiten wurde je 20 sec. mit Luft anstatt mit Ar und CO_2 begast (Fig 13). Dadurch konnte die H_2 -Freisetzung auf ca. 150 h verlängert werden. Bei jeder Zugabe erfolgte auch hier ein kurzfristig starker Rückgang der H_2 -Abgabeaktivität, vermutlich wegen den vorübergehend aeroben Bedingungen. Gelegentliches Zudosieren von reinem N_2 nach dem Erreichen der maximalen Aktivität hatte dagegen keinen stabilisierenden Einfluss. Erst bei besonders ausgewählter Zudosierung, alle 2h 24' schon zu Beginn des Experimentes, konnte die Produktion mit einer hohen Rate über längere Zeit (10 Tage) erhalten werden (Fig. 14).

Bei vielen Versuchen mit ausgehungerten Algenzellen zeigte es sich, dass die Kulturen je nach Aushungerungszustand (-alter) stark verschieden reagieren; zB. werden die Zellen mit zunehmender N-Aushungerung immer empfindlicher gegenüber der Hemmwirkung von Stickstoffverbindungen.

2.2.12. NH_3 -Ausscheidung bei MSO-behandelten Zellen

Fig. 15 zeigt die NH_3 -Konzentration im Medium bei einer Kultur, die nach 22 h N-Aushungerung mit MSO, $10^{-6}M$, behandelt und mit N_2/CO_2 (99/1) begast wurde (30 ml/min). Bei dieser Aenderung der Bedingungen sinkt die H_2 -Produktion stark ab, da N_2 als kompetitiver Hemmstoff der H_2 -Bildung wirkt. Gleichzeitig steigt die Sauerstoffproduktion. Da der Einbau von N_2 in Aminosäuren durch MSO-Zugaben verhindert wird, erscheint nun NH_3 im Medium (maximale Konzentration 1,3 mM). Nach 40 h N_2 -Begasung wurde wieder auf Ar/ CO_2 (99/1) umgestellt. Trotz der relativ hohen NH_3 -Konzentration im Medium wird nun wieder H_2 gebildet; dies, weil NH_3 als Hemmstoff wegen der Wirkung von MSO als Glutaminsynthetase-Inhibitor nicht aktiv ist. In Fig. 15 kommt zusätzlich zum Ausdruck, dass MSO die Sauerstoffproduktion hemmt. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass die gesamte Stoffwechselaktivität

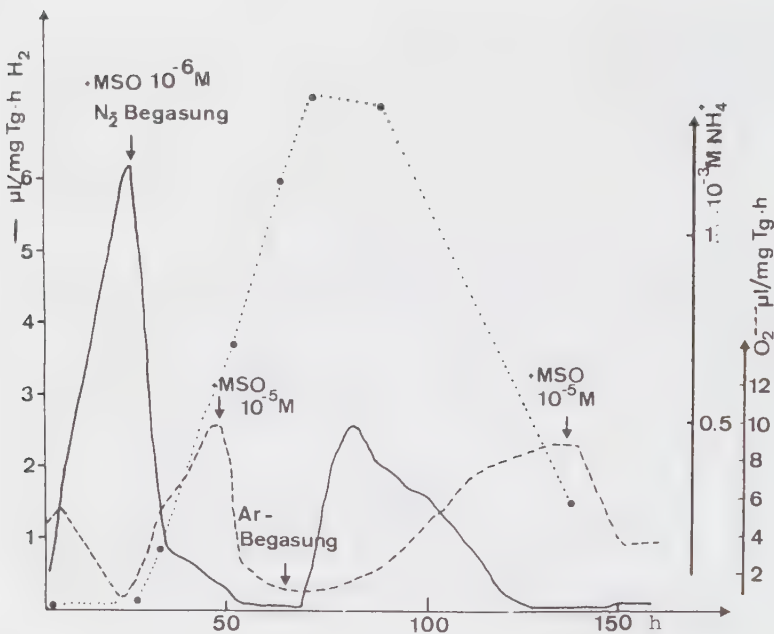


Fig.15: NH_3 -Produktion mit MSO behandelten Zellen

mangels Stickstoffeinbau gehemmt wird (keine oder nur geringe Proteinneusynthese).

2.2.13. Unterschiede bei verschiedenen Organismen

Alle Optimierungsversuche wurden mit verschiedenen Anabaena-Stämmen ausgeführt. Es hat sich gezeigt, dass der Verlauf der H_2 -Produktion während der N-Aushungierung bei allen 4 verwendeten Stämmen sehr ähnlich ist. Zeitpunkt und Höhe der maximalen Aktivität und die Minimalkonzentration für Hemmstoffwirkungen (Fig.11) sind bei verschiedenen Algenstämmen jedoch unterschiedlich. Für eine spätere Anwendung erscheint der Stamm Anabaena cylindrica B-629 am geeignetsten.

Neben Anabaena-Arten wurden auch Nostoc commune, Plectonema boryanum und Mastigocladus laminosus mit derselben Methodik auf

Wasserstoffbildung bei N-Aushungerung getestet.

Mit Plectonema boryanum, eine heterocystenlose Blaualgenart, welche nur unter anaeroben Bedingungen N_2 fixieren kann, wurde eine H_2 -Bildung über 240 h beobachtet. Es wird nur H_2 entwickelt, solange die O_2 -Konzentration relativ gering ist (Fig.16). Für die grossen Schwankungen der Gasproduktion liegen vorläufig keine Erklärungen vor.

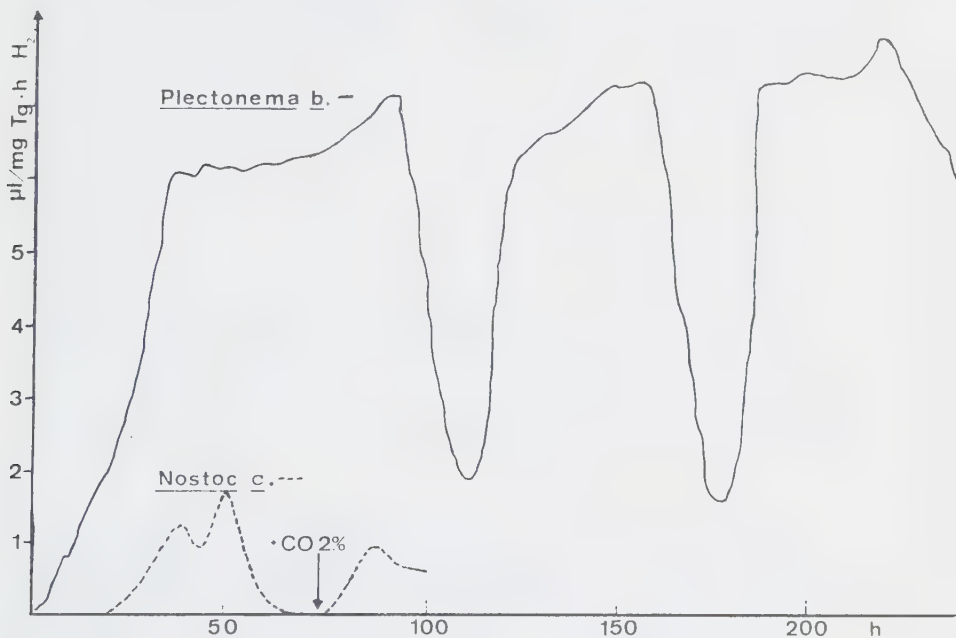


Fig. 16: H_2 -Produktion mit Plectonema boryanum und Nostoc commune.

Bei Nostoc commune (mit Heterocysten), eine Blaualge mit extremer Aggregationstendenz, konnte nur eine sehr geringe H_2 -Abgabe (maximal 0,7 $\mu\text{l/mg Tg.h}$), welche erst nach ca. 20 Stunden Aushungerung beginnt, registriert werden. Um zu prüfen, ob die

H₂-Abgabe durch ein starkes H₂-Aufnahmesystem verhindert wird, wurde die Kultur nach 75 h mit 2 % CO (hemmt die Hydrogenase) begast. Dadurch konnte eine erneute H₂-Produktionsphase induziert werden (Fig 16).

Mastigocladus laminosus, eine thermophile Blaualge, die bei 45°C gezüchtet wurde, zeigt im N-Aushungerungsversuch bei 42°C ein ähnliches H₂-Produktionsprofil wie Anabaena. Die maximale H₂-Produktionsrate betrug jedoch nur 221 µl/mg Chl. h.

DISKUSSION

Die wichtigsten Probleme, welche vorderhand der technischen Verwendung von Blaualgen zur H_2 -Produktion im Wege stehen sind:

1. Blaualgen produzieren neben Wasserstoff auch Sauerstoff, da der Wasserstoff mindestens indirekt von der Photolyse des Wassers resultiert. Bei optimaler H_2 -Freisetzung ist das Verhältnis O_2/H_2 im gebildeten Gasgemisch 1/2. Man müsste also den Sauerstoff vom Gasgemisch abtrennen. Dieses Ziel könnte auch biotechnologisch erreicht werden, indem man ein 2-stufiges System verwendet, wobei zuerst Photosyntheseprodukte (bei O_2 -Abgabe) gebildet, die dann in einer 2. Stufe zur Produktion von H_2 verwendet würden. In dieser zweiten Stufe müsste die O_2 -liefernde Reaktion (PS II) zB. durch Hemmstoffe (45) blockiert werden. Mit einer solchen 2 Stufen-Anlage müsste man natürlich eine erhebliche Effizienzeinbusse in Kauf nehmen. Weitere Möglichkeiten zur Elimination des Sauerstoffes wären chemische Bindung (zB. durch Glukose/Glukose-Oxydase) oder biologische Fixierung, beides Prozesse, die im Hinblick auf eine Anwendung sehr problematisch erscheinen.
2. Zur Begasung mit CO_2 und zum Abführen von O_2 und H_2 wird ein Trägergas, welches ein Edelgas sein muss (Ar), verwendet. Es wurde mit einem offenem System gearbeitet, wobei das durch die Kultur fliessende Edelgas jeweils verloren ging. Bei einer grosstechnischen Anwendung müsste das Edelgas nach dem Begasen der Kultur von H_2 und O_2 getrennt und der Kultur wieder zugeführt werden. Die Ausführung dieser Idee bringt grosse technische Probleme mit sich (Trennung der Gase, Kontrolle von sehr kleinen Gasflüssen bei Laborversuchen sind schwierig). Ein Versuch, bei welchem nur mit CO_2 ohne Edelgas begast wurde, zeigte, dass grosse CO_2 -Konzentrationen die H_2 -Bildung völlig, aber reversibel hemmen.

3. Die Fremdenergie (zB. Rührwerk, welche notwendig ist, um mit Blaualgen Wasserstoff zu produzieren, muss vermindert werden können, um eine positive Energiebilanz zu bekommen. In einer Anlage mit festsitzenden Organismen (Flachkollektor) könnte das Medium energiesparend umgesetzt werden; zudem ist möglicherweise die Stoffwechselstabilität solcher Zellen grösser als in Submerskulturen. In einer kürzlich erschienenen Arbeit demonstrierten Lambert et al. (46), dass es möglich ist, mit immobilisierten Anabaena Zellen (auf Glaskugeln) eine ebensohohe und -stabile H_2 -Produktion zu erzielen wie mit einer gerührten Submerskultur. Es liesse sich eventuell auch die starke Hafttendenz vieler Blaualgen ausnützen.
4. Technische und biologische Probleme, die sich bei einer Uebertragung auf Grossanlagen ergeben, sind gross und zum Teil heute noch nicht voraussagbar. Die Verwendung der thermophilen Blaualge Mastigocladus hätte den Vorteil, dass sie neben einem breiten Temperaturspektrum (25° bis $60^{\circ}C$; eine Kühlung bei starkem Sonneneinfall wäre überflüssig) auch eine grosse chemische (zB. pH) und physiologische (zB. Licht, mechanische Beanspruchung) Widerstandsfähigkeit zeigt. Diese Eigenschaften könnten zur Einsparung von Fremdenergie ausgenützt werden. Zudem zeigt der verwendete Mastigocladus-Stamm (TH) extrem gute Hafteigenschaften, was zur Eliminierung von Rührenergie ausgenützt werden könnte (sh.3.). Die H_2 -produktion von Mastigocladus wurde getestet und ist ganz ähnlich wie diejenige von Anabaena.
5. Die Umwandlungseffizienz des verfügbaren Lichtes in Wasserstoff lag in den N-Aushungerungsversuchen bei ca. 0,4 % (Durchschnitt von 10 Versuchen zwischen den 1. und 3. Tag). Maximale Werte (nach ca. 44-60 h) betrugen 0,9 bis 2,6 %. Bei dem in Fig. 14 dargestellten Versuch konnte eine Stabilisierung erzielt werden, indem während 10 Tagen mit $20 W/m^2$ Belichtungsstärke eine H_2 -Produktion mit maximaler Aktivität ($665 \mu l/mg \text{ Chl.} \cdot h$) und Effizienz (0,65%) beobachtet

wurde. Die höchste maximale Effizienz wurde mit einer Kultur erzielt, bei der die Zelldichte stark erhöht war; zudem war die Begasungsrate kleiner als unter Standardbedingungen. Die hohe Effizienz von maximal 2,6 % lässt sich dadurch erklären, dass das Licht unter Standardbedingungen nicht richtig ausgenutzt werden kann. Anscheinend ist nur ein geringer Teil des unter Standardbedingungen eingestrahnten Lichtes nötig, um dieselbe Wasserstoffproduktion zu erzielen wie mit viel schwächerem Licht, oder mit einem Licht-dunkel Rhythmus. Bei der Verwendung aller optimalen Bedingungen wären noch günstigere Resultate zu erwarten. Zur Erhöhung der Effizienz könnte man anschliessend an die H_2 -Produktion die Biomasse als Energiequelle, zum Beispiel zur Methanproduktion oder als Dünger verwenden.

Die oberste Limite der biologischen Lichtumwandlung bei der Verwendung von Sonnenenergie liegt bei 10 bis 15%. Höchste gemessene Werte bei Algen betragen 13% (gemessen anhand der Biomasseproduktion, 47). Jeffries (42) erzielte bei Verwendung von intermittierendem Licht eine 1 bis 1,7-fach grössere H_2 -Produktion als mit kontinuierlicher Belichtung.

Es hat sich gezeigt, dass einerseits durch günstige Organismenwahl (möglichst mit geringer H_2 -Aufnahmeaktivität) und andererseits durch Manipulation der Inkubationsbedingungen Fortschritte zu erzielen sind. Auf beiden Teilgebieten gibt es noch viele offene Fragen, zB. wie die Regulation der Nitrogenase (Dereprimierung?) während der N-Aushungerung geschieht, oder wie sich die grossen Aktivitätsunterschiede verschiedener Blaualgenstämme erklären lassen. Möglicherweise könnten auch durch genetische Manipulation Fortschritte erzielt werden.

Neben der Produktion von molekularem H_2 durch Blaualgen käme auch die Bildung von NH_3 aus N_2 als energiefixierender Prozess in Frage. Wenn die Glutaminsynthetase durch MSO blockiert wird, so wird bei N_2 -Zugabe NH_3 ins Medium in milimolaren Konzentrationen ausgeschieden. Ein Problem bei einer solchen Ammoniumgewinnung wäre die Konzentrierung und Abtrennung vom Kulturmedium.

ZUSAMMENFASSUNG

Zur Abklärung der Möglichkeit, photosynthetische Mikroorganismen zur Biophotolyse von Wasser einzusetzen, wurde untersucht, unter welchen physiologischen Bedingungen die H_2 -Freisetzung mit grösster Lichtenergieausbeute stattfindet.

Anhand von Kurzzeitexperimenten konnte zunächst gezeigt werden, dass sich Blaualgen aufgrund einer grösseren Produktionsrate, Unempfindlichkeit gegenüber O_2 und hohen Lichtintensitäten und einer grösseren Stabilität besser zur Wasserstoffproduktion eignen als Grünalgen.

Bei Stickstoffaushungerungsexperimenten mit Anabaena-Arten unter Standardbedingungen ($29^{\circ}C$; 40 W/m^2 ; $0,02-0,1 \text{ gTg/l}$; $Ar + CO_2 \text{ 1\%}$, $20 - 30 \text{ ml/min}$; 5 l Flasche ; 300 Upm mit Magnetrührer) wird die maximale H_2 -Produktion ($5 - 25 \text{ } \mu\text{l/mg Tg} \cdot \text{h}$) nach 45 bis 55 h erreicht. Nach 64 bis 76 h beträgt die Aktivität jedoch nur noch 50 % der maximalen. Die maximale Lichtumwandlungseffizienz liegt zwischen 0,2 und 0,9 %. Die H_2 -Freisetzung wird unter den erwähnten Versuchsbedingungen durch den Nitrogenaseenzymkomplex katalysiert.

Hohe Lichtintensität (100 W/m^2) und hohe Temperatur ($35^{\circ}C$) bewirken eine erhöhte maximale H_2 -Produktion, die jedoch mit einer Stabilitätseinbusse verbunden ist. Bei schwacher Lichtintensität (7 W/m^2) oder relativ tiefen Temperatur ($15^{\circ}C$) konnte nur eine geringe, jedoch bis zu 300 h andauernde H_2 -Bildung beobachtet werden.

Die H_2 -Produktion ist relativ unabhängig vom pH des Mediums. In einem Bereich von pH 6 bis 9,5 waren keine signifikanten Unterschiede im H_2 -Produktionsverlauf feststellbar.

Bei verminderter Begasungsrate ($1-2 \text{ ml/min}$) oder mit erhöhter Zelldichte ($1,9 \text{ g/l}$) musste trotz hoher O_2 -Konzentration (bis 20 %) im ausströmendem Gasgemisch keine Einbusse in der

H₂-Produktionsrate in Kauf genommen werden. Die grösste Lichtausbeute (2,6%) wurde in einem Versuch mit kleiner Begasungsrate und grosser Kulturdichte erreicht. Durch die Zugabe von Glukose und Glukose-Oxydase ins Medium konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die H₂-Produktion relativ sauerstoffunempfindlich ist.

Da die verwendeten Blaualgen unter N-Mangel nach wenigen Tagen ihre Stoffwechselaktivität einstellen, wurde untersucht, ob mit kleinen Mengen zugegebenem Stickstoff die H₂-Bildung stabilisiert werden kann. NH₃, ein Hemmstoff der Nitrogenase, wirkt nur in sehr geringen Konzentrationen ($\leq 2 \cdot 10^{-5}$ M) als Stabilisator, wenn die Zugaben nach 60 h Aushungerung erfolgen. Mit zusätzlich zugegebenem MSO (Glutaminsynthetasehemmstoff) konnte nur gerade die negative Wirkung von $5 \cdot 10^{-5}$ M NH₄⁺ verhindert werden. Wurden die Zugaben jedoch schon nach 24 h Aushungerung gemacht, so konnte mit MSO (10^{-6} M) eine grössere Wirkung auch mit relativ hohen NH₄⁺-Konzentrationen (10^{-4} M) erreicht werden.

Eine 22 h lang ausgehungerte Kultur, die anschliessend mit N₂ begast und mit einer MSO Zugabe versehen wurde, schied NH₃ (bis maximal 1,3 mM) ins Medium aus. Wenn wieder auf Ar + CO₂ umgestellt wurde, stellte sich nach einer kurzen lag-Phase trotz hoher NH₃-Konzentration erneut eine H₂-Produktion ein.

Neben Anabaena-Arten wurden auch Nostoc commune, Plectonema boryanum und Mastigocladus laminosus auf ihre Fähigkeit zur Wasserstoffproduktion geprüft. Es zeigte sich, dass mit Anabaena cylindrica B-629 die grössten H₂-Bildungsraten (bis 36 μ l/mg Tg . h) erzielt werden können.

In der Diskussion werden Probleme aufgezeigt, die eine wirtschaftliche H₂-Produktion mit Blaualgen unter Energiegewinn in nächster Zukunft unmöglich erscheinen lassen.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Gray, C.T. und Gest, H.: Biological formation of molecular hydrogen. *Science* 148, 186-192 (1965)
2. Kessler, E.: Hydrogenase, photoreduction and anaerobic growth, p. 456-473. In Stewart, W.D.P. (ed), 'Algal physiology and biochemistry. Blackwell scientific publications , London 1974.
3. Gaffron, H. und Rubin, J.: Fermentative and photochemical production of hydrogen in algae. *J.Gen.Physiol.* 26, 219-240 (1942).
4. Ward, M.A.: Whole cell and cellfree hydrogenases of algae. *Photochemistry* 9, 259-266 (1970)
5. Ben-Amotz, A., Erbes, D.L., Riederer-Henderson, M.A., Peavey, D.G. und Gibbs, M.: H₂ Metabolism in photosynthetic organisms. I. Dark H₂ evolution and uptake by algae and mosses. *Plant Physiol.* 56, 72-77 (1975)
6. Healey, F.P.: The mechanism of hydrogen evolution by Chlamydomonas moewusii. *Plant Physiol.* 45, 153-159 (1970)
7. Healey, F.P.: Hydrogen evolution by several algae. *Planta (Berl.)* 91, 220-226 (1970)
8. Benemann, J.R. und Weare, N.M.: Nitrogen fixation by Anabaena cylindrica . III. Hydrogen-supported nitrogenase activity. *Arch. Microbiol.* 101, 401-408 (1974)
9. Packer, L., Tel-Or, E. und Papageorgiou, G.: The potential of H₂ production by photosynthetic preparations from chloroplasts and cyanobacteria. In Buvet, R. et al. (eds): Living systems as energy converters. North Holland, Amsterdam, S. 129-134 (1977)
10. Bothe, H., Tennigkeit, J. und Eisbrenner, G.: The utilisation of molecular hydrogen by the blue-green alga Anabaena cylindrica. *Arch. Microbiol.* 114, 43-49 (1977)

11. Hallenbeck, P.C., Benemann, J.R.: Characterisation and partial purification of the reversible hydrogenase of Anabaena cylindrica. FEBS Letters 94, 261- 264 (1978)
12. Fujita, Y., Ohoma, H. und Hattori, A.: Hydrogenase activity of a cell free preparation obtained from the blue-green alga Anabaena cylindrica. Plant Cell Physiol. 5, 305-314 (1964)
13. Peterson, R.B., Wolk, C.P.: Localization of an uptake hydrogenase in Anabaena. Plant Physiol. 61, 688-691 (1978)
14. Tel-Or, E., Luijk, L.W., Packer, L.: Hydrogenase in N₂-fixing cyanobacteria. Arch. Bioch. Biophys. 185, 185-194 (1978)
15. Bothe, H., Tennigkeit, J., Eisbrenner, G.: The utilisation of molecular hydrogen by the blue-green alga Anabaena cylindrica. Arch. Microbiol. 114, 43-49 (1977b)
16. Bothe, H., Tennigkeit, J., Eisbrenner, G.: The hydrogenase-nitrogenase relationship in the bluegreen alga Anabaena cylindrica. Planta 133, 237-242 (1977a)
17. Eisbrenner, G., Distler, E., Floener, L., Bothe, H.: The occurrence of the hydrogenase in some bluegreen algae. Arch. Microbiol. 118, 177-184 (1978).
18. Stewart, W.D.P.: Biological and ecological aspects of nitrogen fixation by free-living micro-organisms. Proc.Roy.Soc.B 172, 267-388 (1969)
19. Haystead, A., Robinson, R., Stewart, W.D.P.: Nitrogenase activity in extracts of heterocystous and nonheterocystous blue-green algae. Arch. Microbiol. 74, 235-243 (1970)
20. Stewart, W.D.P., Lex, M.: Nitrogenase activity in the blue green alga Plectonema boryanum strain 594. Arch. Microbiol. 73, 250-260 (1970)
21. Rippka, R., Waterbury, J.B.: Synthesis of nitrogenase by non-heterocystous cyanobacteria. FEMS Microbiol. Letters 2, 83-86 (1977)

22. Kenyon, C.N., Rippka, R., Stanier, R.Y.: Fatty acid composition and physiological properties of some filamentous blue-green algae. *Arch. Microbiol.* 83, 216-236 (1972)
23. Peters, G.A., Evans, W.R., Toia, R.E.: Azolla-Anabaena Azollae relationship, IV. Photosynthetically driven, nitrogenase-catalyzed H_2 production. *Plant Physiol.* 58, 119-126 (1976)
24. Daday, A., Lambert, G.R., Smith, G.D.: Measurement in vivo of hydrogenase-catalysed hydrogen evolution in the presence of nitrogenase enzyme in cyanobacteria. *Biochem. J.* 177, 139-144 (1979).
25. Jones, L.W., Bishop, N.I.: Simultaneous measurement of oxygen and hydrogen exchange from the blue-green alga Anabaena. *Plant Physiol.* 57, 659-665 (1976)
26. Benemann, J.R., Weare, N.M.: Hydrogen evolution by nitrogen-fixing Anabaena cylindrica cultures. *Science* 184, 174-175 (1974)
27. Newton, J.W.: Photoproduction of molecular hydrogen by a plant algal symbiotic system. *Science* 191, 559-561 (1976)
28. Weissman, J.C., Benemann, J.R.: Hydrogen production by nitrogen-starved cultures of Anabaena cylindrica. *Appl. Environ. Microbiol.* 33, 123-131 (1977)
29. Jeffries, T.W., Timourian, H., Ward, R.L.: Hydrogen production by Anabaena cylindrica : Effects of varying ammonium and ferric ions, pH and light. *Appl. Environ. Microbiol.* 35, 707-710 (1978)
30. Arnon, D.I., Mitsui, A., Panaque, A.: Photoproduction of hydrogen gas coupled with photosynthetic phosphorylation. *Science* 134, 1425 (1961)
31. Benemann, J.R., Berenson, J.A., Kaplan, N.O., Kamen, M.D.: Hydrogen evolution by a chloroplast-ferredoxin-hydrogenase system. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 70, 2317-2320 (1973)

32. Fry, I., Papageorgiou, G., Tel-Or, E., Packer, L.: Reconstitution of a system for H_2 evolution with chloroplasts, ferredoxin, and hydrogenase. Zeitschrift für Naturforschung C 32 110-117 (1977)
33. Hoffmann, D., Thauer, R., Trebst, A.: Photosynthetic hydrogen evolution by spinach chloroplasts coupled to a Clostridium hydrogenase. Zeitschrift für Naturforschung C 32, 257-262 (1977)
34. Rao, K.K., Rosa, L., Hall, D.O.: Prolonged production of hydrogen gas by a chloroplast biocatalytic system. BBRC 68, 21-28 (1976)
35. Packer, L., Cullingford, W.: Stoichiometry of H_2 production by an in vitro chloroplast, ferredoxin, hydrogenase reconstituted system. Zeitschrift für Naturforschung C 33, 113-115 (1978)
36. Lambert, G.R., Smith, G.D.: Hydrogen formation by marine blue-green algae. FEBS Letters 83, 159-162 (1977)
37. Mitsui, A., Kumazawa, S.: Hydrogen production by marine photosynthetic organisms as a potential energy resource. In: Biological solar energy conversion (A. Mitsui, S. Miyachi, A. San Pietro, S. Tamura, eds.), pp. 23-49. New York - San Francisco - London: Academic Press 1977
38. Kessler, E., Czygan, F.C.: Physiologische und biochemische Beiträge zur Taxonomie der Gattung Chlorella. IV. Verwertung organischer Stickstoffverbindungen. Arch. Microbiol. 70, 211-216 (1970)
39. Bothe, H., Loos, E.: Effect of far red light and inhibitors on nitrogen fixation and photosynthesis in the blue-green alga Anabaena cylindrica. Arch. Microbiol. 86, 241-254 (1972)
40. Mackinney, G.: Absorption of light by chlorophyll solutions. J. Biol. Chem. 140, 315-322 (1941)

41. Stuart, T.S., Gaffron, H.: The mechanism of hydrogen photo-production by several algae. II. The contribution of photo-system II. Planta (Berl.) 106, 101-112 (1972)
42. Jeffries, T.W., Leach, K.L.: Intermittent illumination increases biophotolytic hydrogen yield by Anabaena cylindrica. Appl. Environ. Microbiol. 35, 1228-1230 (1978)
43. Kessler, E.: Iron supply and hydrogenase activity in green algae. Arch. Microbiol. 61, 77-80 (1968)
44. Stewart, W.D.P., Rowell, P.: Effects of L-Methionine DL-Sulphoximine on the assimilation of newly fixed NH_3 , acetylene reduction and heterocyst production in Anabaena cylindrica. BBRC 65, 846-856 (1975)
45. Spiller, H., Ernst, A., Kerfin, W., Böger, P.: Increase and stabilization of photoproduction of hydrogen in Nostoc muscorum by photosynthetic electron-transport inhibitors. Zeitschrift für Naturforschung c 33, 541-547 (1978)
46. Lambert, G.R., Daday, A., Smith, G.D.: Hydrogen evolution from immobilized cultures of the cyanobacterium Anabaena cylindrica. FEBS Letters 101, 125-128 (1979)
47. Goedheer, J.C., Kleinen-Hammans, J.W.: Efficiency of light conversion by the blue-green alga Anacystis nidulans. Nature 256, 333-334 (1975)

ABKUERZUNGEN

CCCP = Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazon, DCMU = 3(3,4 Dichlorphenyl) 1,1-dimethylharnstoff, DT = Dithionit, DTT = Dithiothreitol, EDTA = Aethylendiaminotriessigsäure-di-Natrium-salz, MSO = Methioninsulfoximin, $TH_2 \text{ max}$ = Zeit nach Beginn der N-Aushungerung, nachdem eine maximale H_2 -Produktion erreicht wird, $TH_2 \text{ max } 1/2$ = Zeit, nach Beginn der N-Aushungerung, nachdem die H_2 -Produktionsrate $1/2$ der maximalen (bei $TH_2 \text{ max}$) beträgt.

Hydrogen Formation by Cyanobacteria Cultures Selected for Nitrogen Fixation

Martin Berchtold and Reinhard Bachofen*

Institut für Pflanzenbiologie, Universität Zürich, Zollikerstr. 107, CH-8008 Zürich, Switzerland

Abstract. Seventy-one cyanobacteria containing cultures were enriched from various soil and water locations either under aerobic and/or anaerobic conditions on agar medium selective for nitrogen fixation. Kept under argon containing 1% CO₂ for 24 and 48 h most of these cultures evolved hydrogen at very variable rates up to 116 µl per mg chlorophyll and hour as a mean value over a time period of 24 h. Several samples evolved hydrogen more efficiently compared with known hydrogen producing pure strains from culture collections. Thirty-one of the investigated cultures showed a hydrogen formation higher than 10 µl per mg chlorophyll and hour measured over 24 or 48 h. Among these all the morphological forms of cyanobacteria i.e. unicellular and filamentous with or without heterocysts are found. Hence, selecting for nitrogen fixing cyanobacteria seems to be a practical method to find efficient hydrogen producers.

Key words: Hydrogen production — Nitrogen fixation — Photosynthesis — Cyanobacteria — Enrichment cultures.

In the last few years several authors proposed the use of hydrogen producing organisms (green algae, cyanobacteria and Rhodospirillaceae) for practical purposes in solar energy conversion (Benemann and Weare, 1974; Weissman and Benemann, 1977; Jeffries et al., 1978; Neil et al., 1976; Zürcher and Bachofen, 1979). Since the enzyme nitrogenase catalyses besides the fixation of molecular nitrogen also the reduction of protons to yield hydrogen, it seems to be interesting to investigate nitrogen fixing organisms for their ability to produce hydrogen with solar energy. Among cyanobacteria a

considerable number of species is able to reduce molecular nitrogen to ammonia. Under aerobic conditions only heterocystous and a few unicellular algae seem to be able to incorporate molecular nitrogen (Stewart, 1969; Wyatt and Silvey, 1969). Under anaerobic or microaerobic conditions however also non-heterocystous filamentous species are described to have an active nitrogenase (Stewart and Lex, 1970; Rippka and Waterbury, 1977; Kenyon et al., 1972).

While hydrogen production by photosynthetic bacteria is dependent on the supply of an appropriate organic substrate (Gest et al., 1962; Ormerod et al., 1961), there is no such need in green algae or cyanobacteria.

The nitrogenase dependent hydrogen evolution of cyanobacteria is more stable and more efficient than the hydrogen production in green algae catalysed by a hydrogenase (Weissman and Benemann, 1977). Besides nitrogenase, most cyanobacteria contain also a hydrogenase. In *Anabaena cylindrica* this enzyme exists in two forms, a reversible one (Hallenbeck and Benemann, 1978; Fujita et al., 1964) and one giving rise to hydrogen uptake (Peterson and Wolk, 1978). In this organism the total in vivo enzyme activity is shifted towards hydrogen uptake (Tel-Or et al., 1978; Bothe et al., 1977a, b; Eisbrenner et al., 1978).

Through environmental regulation it is possible to reach substantial hydrogen production with *Anabaena cylindrica* with a light energy conversion efficiency of 0.35% over a period of 28 days in dim light (6 W/m²) (Jeffries et al., 1978) and of 0.4% during one week with a medium light intensity (20 W/m²) (Weissman and Benemann, 1977).

Since there are rather large differences in the hydrogen production reported by different authors with the same cyanobacterial species (Bothe et al., 1977b; Benemann and Weare, 1974), it is probable that even among the same species there exist substantial differences in the hydrogen metabolism. There may be a

* To whom offprint requests should be sent

great variation especially in the activity of the uptake hydrogenase, diminishing the amount of hydrogen produced in the light. On this background one should be able to find strains of cyanobacteria with higher hydrogen production than the ones exhibited by the few heterocystous strains of the *Anabaena* and *Nostoc* genus so far examined (Eisbrenner et al., 1978; Jeffries et al., 1978; Weissman and Benemann, 1977; Tel-Or et al., 1977; Jones and Bishop, 1976; Peters et al., 1976). Lambert and Smith (1977) gave evidence that also some marine heterocystous cyanobacteria are able to produce hydrogen upon illumination and among tropical marine cyanobacteria Mitsui and Kumazawa (1977) successfully isolated strains with high rates of hydrogen production. In this paper we describe a variety of different cyanobacteria being able to produce hydrogen at rates comparable to the ones found with the few laboratory cultures so far tested for H_2 photoproduction. The origins of these enrichment cultures are ecosystems near Zürich.

Materials and Methods

Seventy-one samples were collected in 20 ml vials from terrestrial and aquatic ecosystems in the surrounding of the Institute of Plant Biology of the University of Zürich. Liquid samples contained 10 ml each, solid samples were adjusted to 10 ml with medium (composition see below). All samples were kept at room temperature at low light intensity (around $5 W m^{-2}$) for about 1 month. Part of the biomass was transferred on agar slants. The medium used was selective for nitrogen fixing cyanobacteria, lacking combined nitrogen and organic carbon. The slants were incubated at a constant temperature of 28 °C at low light intensity as before, either aerobic or anaerobic in a gas phase containing N_2 , H_2 and CO_2 . The latter conditions may also allow growth of some photosynthetic bacteria. Growing colonies were transferred into new tubes bimonthly for one and a half year using aseptic techniques. The slants showing coloured growing colonies after several transfers were considered to contain cyanobacteria. These cultures were then moved into 9 ml vials. After being evacuated for 10 min and sealed with butyl rubber septa, they were flushed for 10 min with Ar, containing 1% CO_2 . Evacuation and flushing were repeated twice. The samples were then incubated in an illuminated Warburg bath at 28 °C at a light intensity of $20 W m^{-2}$. After 24 and 48 h, 1 ml gas samples were taken with gas-tight syringes and injected into a gas chromatograph (Gow-Mac 550). Hydrogen concentrations were calculated from a calibration curve obtained with the help of an integrator (Minigrator, Spectra Physics). Corrections were made for the pressure change while sampling. From each vial only one gas sample was analysed.

Throughout the enrichment phase the medium of Bothe and Loos (1972) was used for all samples with the following changes: half the concentrations of $CaCl_2$ and $MnCl_2$ were used, Fe was 4 times, Mo 20 times more concentrated. Furthermore the mineral salts were supplemented with Co (0.03 mg l) and Vit. B_{12} (0.5 µg l).

Chlorophyll was measured by filtration of 5 ml of the cell suspension through a glass fiber filter. The loaded filter was first washed with distilled water and the pigments then extracted by immersing it in 5 ml of methanol for 12–18 h in the dark at 4 °C. The supernatant after centrifugation (10 min at $3,000 \times g$) was analysed spectrophotometrically at 665 and 750 nm. The chlorophyll concentration was calculated as $(OD_{665} - OD_{750}) \cdot 13.4$ (mg Chl a l) after MacKinney (1941).

Besides the enrichment cultures described above, also several strains from culture collections were tested for hydrogen evolution in the light. *Anabaena cylindrica* 1403-2 was obtained from the Algensammlung des Pflanzenphysiologischen Institutes der Universität Göttingen, *Gloeocapsa* sp. LB 795, *Cylindrospermum* sp. 942, *Anabaena maerquardtii* B381, *Anabaena cylindrica* B629, *Anabaena flos-aquae* 1434, *Nostoc commune* 486 and *Plectononema boryanum* 594 were from Dr. Starr of the University of Texas, Austin. *Mastigocladus laminosus* TH was a gift from Dr. A. Binder.

Results

From a total of 71 collected samples, 55 showed growth in the enrichment medium under aerobic conditions. With 24 samples growth was observed under anaerobic conditions in a gas phase containing H_2 , N_2 and CO_2 . Of a total of 79 cultures tested for hydrogen production in the light, only 7 samples were negative. Several samples liberated hydrogen in the light with aerobic as well as with anaerobic enrichment conditions. These samples are labelled with the index n in Table I in the list of the anaerobic cultures.

All types of cyanobacteria, unicellular or filamentous with or without heterocysts, were found among the actively hydrogen producing cultures previously grown under aerobic or anaerobic conditions. In Table I the results of the gas determinations of 31 hydrogen producing samples are given. They are listed for their ability to produce hydrogen with a minimal rate of 10 µl H_2 /mg chlorophyll and hour, calculated either from the measurements after 24 or 48 h. Of these samples the prevailing species were determined by light microscopy and indicated in Table I. Since the medium used is strictly selective for cyanobacteria, heterotrophic bacteria can only grow at the expense of substrates produced by the cyanobacteria.

Table 2 gives the results of the hydrogen production by several strains of cyanobacteria available from culture collections for comparison under the same assay conditions.

Table 3 compares the rate of hydrogen production by a member of each morphological group under different conditions. These results allow to differentiate between hydrogen evolution catalysed either by nitrogenase or hydrogenase and furthermore give an approximate estimation of the coupling of the hydrogen metabolism to the photosynthetic reactions. The effects of NH_3 , an inhibitor of nitrogenase, or of the uncoupler CCCP demonstrate clearly, that with all enriched cultures tested, nitrogenase is the main enzyme catalyzing hydrogen evolution. Furthermore, the reaction is strongly light dependent. Hydrogen production in the dark amounts for maximal a few percent of the production in the light when the measurements are taken after 24 h. However after 48 h this may increase up to 23%, indicating that part of the cell material

Table 1. Activity of H₂- and O₂-liberation with enrichment cultures in the light. Colours, bg = bluegreen, br = brown, dg = darkgreen, g = green, o = olive, v = yellow. Genus names in parenthesis means other cyanobacteria found in the cultures with a biomass part over about 20% of the total

Sample identification	Prevailing genus	Colour	Mean gas production (µl.mg Chl · h)			
			H ₂ (24 h)	H ₂ (48 h)	O ₂ (24 h)	O ₂ (48 h)
Aerobic without Heterocysts						
A 14	<i>Plectonema</i> (<i>Nostoc</i>)	bg	10.7	22.7	1,447	1,117
BG 1	<i>Lyngbya</i>	bg	35	1.5	617	115
BG 2	<i>Lyngbya</i>	g	0.58	25.7	52	926
BG 3	<i>Mikrocoleus</i> (<i>Gloethece</i>)	g	15.2	1.3	5,318	1,599
BG 6	<i>Lyngbya</i>	y	5.9	17.7	1,050	401
BG 11	<i>Lyngbya</i> (<i>Scytonema</i>)	bg	16.5	63	5,181	2,295
BG 18	<i>Lyngbya</i> (<i>Scytonema</i>)	br	17.6	31.7	2,151	1,000
BG 23	<i>Lyngbya</i>	y	4.6	62	925	2,530
Z 5	<i>Lyngbya</i>	br	32	0.61	136	2,075
Z 9	<i>Lyngbya</i>	o	87	1.4	0	190
Aerobic with Heterocysts						
A 4	<i>Tolypothrix</i>	br	0.55	32.8	10	1,243
A 6	<i>Scytonema</i>	br	5	26	945	703
A 9	<i>Nostoc</i>	br	68.5	6.9	196	7,102
A 10	<i>Nostoc</i> (<i>Stigonema</i>)	o	3.1	12.8	2,646	1,241
A 18	<i>Stigonema</i>	dg	19.4	21.1	756	2,092
A 21	<i>Stigonema</i>	o	3.4	12.2	1,281	1,759
BG 4	<i>Scytonema</i> (<i>Lyngbya</i>)	y	8.3	12.6	2,897	1,483
BG 15	<i>Scytonema</i> (<i>Chroococcus</i>)	dg	26.3	40	2,289	1,390
BG 22	<i>Scytonema</i> (<i>Calothrix</i>)	br	22.8	18.9	802	423
BG 24	<i>Scytonema</i> (<i>Lyngbya</i>)	bg	50.6	0.62	4,789	158
Aerobic single cell						
A 17	<i>Chroococcus</i>	g	3.8	25.5	5,776	3,363
BG 13	<i>Gloethece</i> (<i>Lyngbya</i>)	y	71.9	46.7	5.5	111
BG 20	<i>Chroococcus</i> (<i>Lyngbya</i>)	y	11.1	40	684	170.4
Anaerobic without Heterocysts						
A 5 n	<i>Lyngbya</i>	g	2.45	15.9	1,973	3,846
BG 15 n	<i>Lyngbya</i>	g	9.3	5	378	0
BG 19 n	<i>Lyngbya</i>	g	54.1	0	390	1,233
Z 2 n	<i>Lyngbya</i>	bg	3.4	42	465	56
Z 3	<i>Lyngbya</i>	bg	5.8	116	1,955	61
Z 12 n	<i>Plectonema</i>	bg	2.78	29.3	1,436	0
Anaerobic with Heterocysts						
A 1 n	<i>Nostoc</i>	o	38	33	2,510	0
Anaerobic single cell						
A 21 n	<i>Chroococcus</i>	g	5.2	22.9	528	57

produced in the light is converted into hydrogen either by the cyanobacteria themselves or by contaminating bacteria in the dark.

Summerizing the data collected in Table 1–3, a great variability in activity to produce hydrogen in the light is observed. Interesting enough, some strains show a larger mean hydrogen or oxygen production during

the first 24 h in the light, others have a higher rate taking the value obtained after 48 h.

Compared with strains from culture collections the behaviour against inhibitors or the dark/light ratio of the samples listed in Table 3 is quite similar. For *Anabaena cylindrica* dark/light ratios of 0.05–0.14 and remaining activities of H₂ production in the light after

Table 2. Activity of H₂- and O₂-liberation with strains from culture collections. Abbreviations for colours see Table 1

Strain	Colour	Mean gas production (μl-mg Chl · h)			
		H ₂ (24 h)	H ₂ (48 h)	O ₂ (24 h)	O ₂ (48 h)
Anaerobic filamentous					
<i>Plectonema boryanum</i> 524	g	22.5	0	2,148	553
Aerobic single cell					
<i>Gloeocapsa</i> LB 795	o	0.26	0.34	1,582	645
Aerobic filamentous with Heterocysts					
<i>Cylindrospermum</i> sp. 942	y	0.26	0.124	19	31
<i>Anabaena cylindrica</i> B 629	bg	21.9	55.6	845	1,226
<i>Anabaena cylindrica</i> 1403-2	bg	9.55	0.123	2,279	484
<i>Anabaena flos aquae</i> 1444	g	3.55	16.8	3,540	1,074
<i>Anabaena inaequalis</i> B 381	bg	38.3	35.8	3,424	1,440
<i>Nostoc commune</i> 486	o	0.25	1.5	872	844
<i>Mustigocladus laminosus</i> Th	g	0.13	4	186	606

Table 3. Inhibition of hydrogen production in the light by NH₃ and CCCP and ratio of hydrogen production in the dark and in the light. 100% activity in the absence of an inhibitor was in the range as indicated in Table 2 (2.6–120 μl H₂/mg Chl · h). However, variations up to a factor of 25 were observed, due to the age of the cells and the growth under non optimal culture conditions

Sample Identification	Remaining activity of H ₂ evolution in 24 h in % of control		Dark light ratio of H ₂ production in	
	+ NH ₃ , 10 ⁻² M	+ CCCP, 2 · 10 ⁻⁵ M	24 h	48 h
Z3	3.5	3.8	0.09	0.04
A1n	1.0	0.5	0.02	0.02
A21n	1.3	3.7	0.03	0.02
BG13	1.0	0.4	0.07	0.08
A9	1.0	0.3	0.01	0.22
Z9	1.6	0.3	0.02	0.05

addition of NH₃ or CCCP of 0–3.3% are reported (Benemann and Weare, 1974; Bothe et al., 1977a; Daday et al., 1977).

It can be clearly seen that the rates for oxygen evolution under our assay conditions are for most cases much higher than the rates for hydrogen production. If both gases would originate directly from a water splitting reaction, one would assume a ratio of 1:2 (O₂/H₂). Of special interest may be the first group of organisms mentioned in Table 1, those enriched under aerobic conditions in the absence of bound nitrogen and organic substrates, but having a filamentous morphology without heterocysts. Under these conditions one would not expect to obtain filamentous cyanobacteria without heterocysts producing hydrogen, since those are thought so far to lack the enzymatic system

necessary for nitrogen fixation and consequently also hydrogen liberation in the light. Until these strains are isolated as pure cultures, no general conclusions from these observations can be made. From a collection of isolated cyanobacteria, also Radway et al. (1977) found one nonheterocystous filamentous species with an extreme high hydrogen liberation capability.

Discussion

The data presented in Table 1–3 indicate that the ability to produce hydrogen in the light is a common property among a large group of morphological types of cyanobacteria and is independent of the ecosystem the algae are collected from. The highest rates of hydrogen production in enrichment cultures were higher than the ones found with pure strains from culture collections under the same assay conditions.

It has to be kept in mind that the cultures enriched in cyanobacteria as indicated in Table 1 by the prevailing species found, are not free of bacterial contamination. These bacteria may influence the gas metabolism of the cyanobacteria either by their own enzymes reacting with hydrogen or oxygen in the gas phase of the sample or by excreting substances. By the enrichment technique used, only few different species of cyanobacteria may grow from one collected sample. Slowly growing species may have been lost. Furthermore, it cannot be excluded that certain species were enriched in more than one of the samples tested.

Differences in hydrogen production among the different enrichment cultures can be explained by several physiological or biochemical properties of the cells present:

a) Strong dependency of the hydrogen production in the light on the age of the culture (Daday et al., 1977; own unpublished observations).

b) Differences in the enzymes liberating molecular hydrogen (e.g. K_m , regulation and rate of synthesis).

c) Differences in the sensitivity of the hydrogenase and nitrogenase towards oxygen.

d) Uptake of hydrogen by an active hydrogenase. The activity of the enzyme is induced under certain conditions (Tel-Or et al., 1977; Eisebrenner et al., 1978).

e) Limitation of the essential elements N and C, i.e. the absence of a nitrogen source or only small concentrations of CO_2 during the assay. The nitrogen starvation which is effective under the assay conditions used, is coupled to an increased nitrogenase activity and great morphological changes. These well investigated phenomena with cells of *Anabaena cylindrica* (De Vasconcelos and Fay, 1974) could vary among different species.

f) Contaminating bacteria may be involved in the gas metabolism of the samples either by producing hydrogen or CO_2 or especially by consuming hydrogen or oxygen.

Taking these possible drawbacks into account, it is not possible to discuss the variety of data given in Table 1 from a biochemical standpoint. From Table 2 however it is obvious that also with pure cultures a comparable diversity is obtained. Photosynthetic activity as measured by oxygen evolution or hydrogen production are not constant over 2 days because of accumulation of these gaseous products and furthermore, no relation between the two activities is obvious. From Table 1 and 2 it can be seen that over the measured time period much more oxygen than hydrogen is produced. This is explained by the fact that for efficient hydrogen production the used screening conditions were not optimal. With continuous gasing (Argon and CO_2 1%) after a time of 40–60 h a H_2/O_2 ratio up to 2 and rates of H_2 evolution up to 7 500 $\mu\text{l}/\text{mg Chl.} \cdot \text{h}$ with *Anabaena cylindrica* 1403-2 or B 629 were obtained. This is in agreement with reported data from Weissman and Benemann (1977) and Jeffries et al. (1978) with *Anabaena cylindrica*.

Further experiments with pure cultures of selected strains isolated from the samples described here under strictly controlled conditions are necessary to prove the technical potential of such a biological system as solar energy converter. Searching for especially effective hydrogen producing cyanobacteria in diverse ecosystems could be one way to find biocatalysators with high efficiency in converting light energy into chemical energy in the form of a fuel for practical use.

Acknowledgement. We wish to thank H. Preisig for the determination of the genera of the investigated cyanobacteria listed in table one. The

work was supported by the Schweizerische Nationalfonds project No. 4.048.0.76.04 (nationales Forschungsprogramm Energie).

References

- Benemann, J. R., Weare, N. M.: Hydrogen evolution by nitrogen-fixing *Anabaena cylindrica* cultures. *Science* **184**, 174–175 (1974)
- Bothe, H., Loos, E.: Effect of far red light and inhibitors on nitrogen fixation and photosynthesis in the blue-green alga *Anabaena cylindrica*. *Arch. Microbiol.* **86**, 241–254 (1972)
- Bothe, H., Tennigkeit, J., Eisebrenner, G.: The utilization of molecular hydrogen by the blue-green alga *Anabaena cylindrica*. *Arch. Microbiol.* **114**, 43–49 (1977b)
- Bothe, H., Tennigkeit, J., Eisebrenner, G.: The hydrogenase-nitrogenase relationship in the bluegreen alga *Anabaena cylindrica*. *Planta* **133**, 237–242 (1977a)
- Daday, A., Platz, R. A., Smith, G. D.: Anaerobic and aerobic hydrogen gas formation by the blue-green alga *Anabaena cylindrica*. *Appl. and Environ. Microbiol.* **34**, 478–483 (1977)
- Eisebrenner, G., Distler, E., Floener, L., Bothe, H.: The occurrence of the hydrogenase in some blue-green algae. *Arch. Microbiol.* **118**, 177–184 (1978)
- Fujita, Y., Ohoma, H., Hattori, A.: Hydrogenase activity of a cell free preparation obtained from the blue-green alga *Anabaena cylindrica*. *Plant Cell Physiol.* **5**, 305–314 (1964)
- Gest, H., Ormerod, J. G., Ormerod, K. S.: Photometabolism of *Rhodospirillum rubrum*: Light-dependent dissimilation of organic compounds to carbon dioxide and molecular hydrogen by an anaerobic citric acid cycle. *Arch. Biochem. Biophys.* **97**, 21–33 (1962)
- Hallenbeck, P. C., Benemann, J. R.: Characterisation and partial purification of the reversible hydrogenase of *Anabaena cylindrica*. *FEBS Letters* **94**, 261–264 (1978)
- Jeffries, T. W., Timouran, H., Ward, R. L.: Hydrogen production by *Anabaena cylindrica*: Effects of varying ammonium and ferric ions, pH and light. *Appl. Environ. Microbiol.* **35**, 704–710 (1978)
- Jones, L. W., Bishop, N. I.: Simultaneous measurement of oxygen and hydrogen exchange from the blue-green alga *Anabaena*. *Plant Physiol.* **57**, 659–665 (1976)
- Kenyon, C. N., Rippka, R., Stanier, R. Y.: Fatty acid composition and physiological properties of some filamentous blue-green algae. *Arch. Microbiol.* **83**, 216–236 (1972)
- Lambert, G. R., Smith, G. D.: Hydrogen formation by marine blue-green algae. *FEBS Letters* **83**, 159–162 (1977)
- MacKinney, G.: Absorption of light by chlorophyll solutions. *J. Biol. Chem.* **140**, 315–322 (1941)
- Mitsui, A., Kumazawa, S.: Hydrogen production by marine photosynthetic organisms as a potential energy resource. In: Biological solar energy conversion (A. Mitsui, S. Miyachi, A. San Pietro, S. Tamura, eds.), pp. 23–49. New York, San Francisco, London: Academic Press 1977
- Neil, G., Nicholas, D. J. D., Bockris, J. O. M., McCann, J. F.: Photosynthetic production of hydrogen. *Int. J. Hyd. Energy* **1**, 45–48 (1976)
- Ormerod, J. G., Ormerod, K. S., Gest, H.: Light-dependent utilisation of organic compounds and photoproduction of molecular hydrogen by photosynthetic bacteria: Relationships with nitrogen metabolism. *Arch. Biochem. Biophys.* **94**, 449–463 (1961)
- Peters, G. A., Evans, W. R., Toia, R. E.: *Azolla-Anabaena Azollae* relationship. IV. photosynthetically driven, nitrogenase-catalyzed H_2 production. *Plant Physiol.* **58**, 119–126 (1976)
- Peterson, R. B., Wolk, C. P.: Localization of an uptake hydrogenase in *Anabaena*. *Plant Physiol.* **61**, 688–691 (1978)

- Radway, J., Rosner, D., Greenbaum, J., Haynes, L.: Hydrogen producing tropical marine photosynthetic microorganisms - isolation and morphology. *Plant Physiol.* **59**, 20 (1977)
- Rippka, R., Waterbury, J. B.: Synthesis of nitrogenase by non-heterocystous cyanobacteria. *FEMS Microbiol. Letters* **2**, 83-86 (1977)
- Stewart, W. D. P., Lex, M.: Nitrogenase activity in the blue green alga *Plectonema boryanum* strain 594. *Arch. Microbiol.* **73**, 250-260 (1970)
- Stewart, W. P. D.: Biological and ecological aspects of nitrogen fixation by free-living micro-organisms. *Proc. Roy. Soc. B* **172**, 267-388 (1969)
- Tel-Or, E., Lujik, L. W., Packer, L.: An inducible hydrogenase in cyanobacteria enhances N_2 fixation. *FEBS Letters* **78**, 49-52 (1977)
- Tel-Or, E., Lujik, L. W., Packer, L.: Hydrogenase in N_2 -fixing cyanobacteria. *Arch. Biochem. Biophys.* **185**, 185-194 (1978)
- De Vasconcelos, L., Fay, P.: Nitrogen metabolism and ultrastructure in *Anabaena cylindrica*, I. The effect of nitrogen starvation. *Arch. Microbiol.* **96**, 271-280 (1974)
- Weissman, J. C., Benemann, J. R.: Hydrogen production by nitrogen-starved cultures of *Anabaena cylindrica*. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**, 123-131 (1977)
- Wyatt, J. T., Silvey, J. K. G.: Nitrogen fixation by *Gloeocapsa*. *Science* **165**, 908-909 (1969)
- Zürcher, H., Bachofen, R.: Hydrogen production by the photo-synthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **37**, 783-793 (1979)

Received April 30, 1979

ERGÄNZUNGEN ZUR PUBLIKATION IM ARCHIV FOR MICROBIOLOGY

Die untersuchten Blaualgen-Anreicherungskulturen stammen von folgenden Standorten:

- A1-15 Wald, feste Unterlage (Boden, Bäume, Steine), Umgebung Rumensee
- A16-25 Wald, Gewässer (Seen, Bäche, Tümpel) Umgebung Rumensee
- Z1-6 Zoologischer Garten Zürich, von fester Unterlage (Boden, Mauern, innen und aussen)
- Z7-12 Zoologischer Garten Zürich, Flüssigproben (Aquarien, Tümpel, innen und aussen)
- BG1-11 Botanischer Garten Zürich, feste Unterlage (Boden, Mauern, Pflanzen, innen und aussen)
- BG12-28 Botanischer Garten Zürich, Flüssigproben (Wasserpflanzenbecken, Teiche, innen und aussen)
- S1-6 Zürichseeufer

Von den in der Publikation angegebenen 79 Blaualgenanreicherungskulturen erwiesen sich später 10 als nichtwachsend. In Tabelle 4 ist die H_2 - und O_2 -Produktion dieser 69 Kulturen dargestellt. Von diesen zeigten 8 weder beim 24 stündigen, noch beim 48 stündigen H_2 -Bestimmungsansatz eine Aktivität.

Tab.4 : Gasproduktion mit angereicherten Blaualgenkulturen

I a ANAEROBE fädige

Stamm Nr.	Farbe	durchschnittliche Gasproduktion(μ l/mg Chl.h)			
		H ₂ (24h)	H ₂ (48h)	O ₂ (24h)	O ₂ (48h)
A1 n	oliv (mit Heterocysten)	38,3	32,9	2509	0
A4 n	grün	0,3	0,115	269	946
A5 n	grün	2,45	15,9	1973	3846
A6 n	dunkelgrün	0	0	2579	2424
A10 n	dunkelgrün	0,88	0,4	1896	972
A16 n	dunkelgrün	0	6	0	0
A24 n	grün	0	0	0	145
BG4 n	dunkelgrün	0	0	8941	6400
BG15 n	braungrün	9,3	4,99	378	0
BG16 n	oliv	0,28	0,23	4110	1661
BG18 n	dunkelgrün	1,8	0,47	322	168
BG19 n	grün	54,1	0	390	1233
BG25	dunkelgrün	0	0	5191	5148
BG26	dunkelgrün	0,26	0,46	3792	2132
BG28	grün	0	0	621	2404
Z2 n	blaugrün	3,47	42,1	465	56
Z3	blaugrün	5,8	116,3	1955	61
Z4	dunkelgrün	0,57	2,1	61,5	698
Z5	dunkelgrün	0	0	3052	2012
Z9 n	dunkelgrün	0	0,08	750	2637
Z12 n	blaugrün	2,78	29,4	1436	0

I b ANAEROBE einzellige

A19 n	grün-gelb	3,9	5,3	116	478
A21 n	grün	5,2	22,9	528	57

Stamm Nr.	Farbe	durchschnittliche Gasproduktion (µl/mg Chl.h)			
		H ₂ (24h)	H ₂ (48h)	O ₂ (24h)	O ₂ (48h)

II a AEROBE einzellige

A2	gelbgrün	0,95	7,3	2890	3314
A3	grünbraun	5	6,93	1213	467
A11	gelbgrün	0,65	0,45	1978	1128
A17	orange-grün	3,8	25,5	5776	3363
BG13	gelbbraun	71,9	46,7	515	111
BG20	gelb	11,1	40	684	170,4
BG27	gelbbraun	0	0	1200	583
S6	grün	0,78	0,64	2301	3133
Z2	gelbgrün z.T.fädig	8,93	0,64	206	172

II b AEROBE fädige

1) ohne Heterocysten

A1	orangebraun	0	3,8	2350	1705
A5	grün	0,21	0,53	977	622
A7	dunkelgrün	0,36	2,2	2062	1576
A8	dunkelgrün	0,092	0,4	412	573
A12	dunkelgrün	0	0	1448	404
A13	dunkelgrün	0,53	0,25	2084	2238
A14	blaugrün	10,65	22,7	1447	1117
A15	orange	0,27	2,7	48	27
A16	dunkelgrün z.T. verzweigt	4,81	0,84	5767	3363
A19	grün	1	0,46	1611	1400
A20	dunkelgrün	6,08	0,65	896	174
A24	dunkelgrün, verzweigt	0,24	0,01	859	174
A25	dunkelgrün	0,053	0,039	315	3131
BG1	blaugrün	35,3	1,45	617	115
BG2	grün	0,58	25,7	52	926
BG3	grün	15,2	1,3	5318	1599
BG6	gelb	5,9	17,7	1050	400,8
BG11	gelbgrün	16,54	63,1	5181	2295

Stamm Nr.	Farbe	durchschnittliche Gasproduktion (ul/mg Chl.)			
		H ₂ (24h)	H ₂ (48h)	O ₂ (24h)	O ₂ (48h)

II b AEROBE fädige

1) ohne Heterocysten (Fortsetzung)

BG18	braun	17,6	31,7	2151	1000
BG19	dunkelgelbgrün	1,1	6,2	1331	2148
BG23	gelb	4,65	62,1	925	2530
Z1	grün	0,59	0,51	1058	76
Z5	braun	32,1	0,61	136	2075
Z9	oliv	87	1,39	0	190
Z12	grün	8,93	0,64	172	136

2) mit Heterocysten

A4	braun	0,55	32,8	10	1243
A6	braun	5	26,1	945	703
A9	braun	68,5	6,9	196	7102
A10	oliv	3,1	12,8	2646	1241
A18	dunkelgrün	19,1	21,1	756	2092
A21	oliv	3,4	12,2	1281	1759
A23	grünbraun, verzweigt	1,29	0,82	547	205
BG4	gelb	8,3	12,6	2897	1390
BG9	dunkelbraun	6,71	0,65	1071	85
BG15	dunkelgrün	26,3	40	2289	1390
BG22	braun	22,86	18,9	802	423
BG24	blaugrün	50,6	0,62	4789	157,3

VERDANKUNGEN

Für die ständige Betreuung während meiner Doktorarbeit danke ich Herrn Prof. Dr. R. Bachofen, für die Anfertigung von EM-Bildern Frau Dr. R. Meyer und für die Bestimmung der Blaualgengattungen Herrn Dr. H. Preisig.

CURRICULUM VITAE

Martin Berchtold, von Uster

geboren am 7. April 1949 in Uster

- 1956 - 1965 Primar- und Sekundarschule in Uster
- 1965 - 1969 Kantonales Wirtschaftsgymnasium in Zürich
- 1969 Herbst, Abschluss mit kantonaler Maturität.
Immatrikulation an der Philosophischen
Fakultät II der Universität Zürich
- 1969 - 1975 Studium mit Hauptfach Mikrobiologie; Fächer
der 1. Vorprüfung: Mathematik, organische
Chemie; der 2. Vorprüfung: Biochemie, allge-
meine Zoologie; der Schlussprüfung: allgemeine
Botanik, Mikrobiologie, Molekularbiologie.
Diplomarbeit mit dem Titel: "Zyklisches Adenosin
Monophosphat als Regulator der Chlorophyllsyn-
these bei Chlorella fusca?" unter Leitung von
Prof. Dr. R. Bachofen
- seit 1975 Mitwirken an verschiedenen Kursen und Praktika
als Assistent
- 1976 - 1979 Dissertation unter der Leitung von Prof. Dr. R.
Bachofen

Während meiner Ausbildung an der Philosophischen Fakultät II
der Universität Zürich besuchte ich Vorlesungen, Kurse, Praktika
und Uebungen folgender Dozenten:

K. Akert, R. Bachofen, J. Biegert, M. Billeter, M. Birnstiel,
E. Bolliger, H. Burla, P.S. Chen, H. Christen, C.D.K. Cook, H.C.
Curtius, B. Eller, P. Endress, C.H. Eugster, H. Hadorn,
K. Hanselmann, H. Hediger, H.R. Hohl, R. Humbel, R. Hütter,
H. Joyet, H. Jungen, J. Kägi, F. Knüsel, E. Kubli, H. Kummer,
F. Leuthardt, H. Lutz, R. Nöthiger, H. Oswald, R. Parish,
D. Rast, J. Schlittler, H. Schmid, K. Schneider, P. Tardent,
E. Thomas, H. Wanner, B. van der Waerden, H. Weber, Ch. Weiss-
mann, K.H. Wüthrich.



